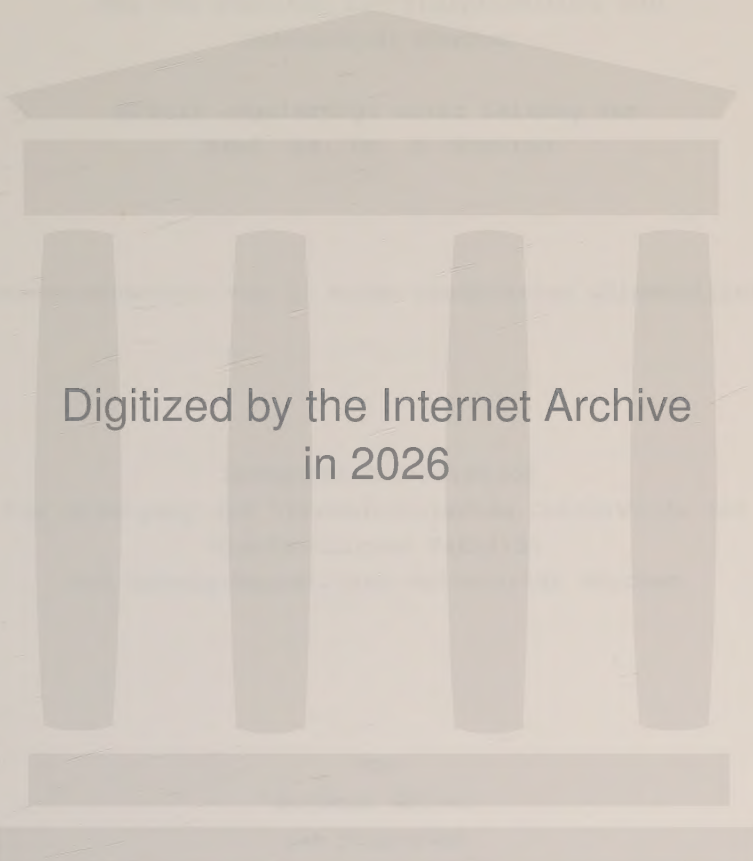


**Chromosomenmuster
von in vitro etablierten Gliomzelllinien**

Barbara Wöhler

Disbui. München
1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0094

Aus dem Institut für Tierpathologie der
Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Chromosomenmuster von in vitro etablierten Gliomzelllinien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Barbara Wöhler
aus Wuppertal

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Korreferent: Prof. Dr. Dr.habil. G. Brem

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Meinen Eltern

INHALTSÜBERSICHT	Seite
A. EINLEITUNG	3
B. LITERATURÜBERSICHT	7
I. Karyotypentwicklung von Gliomzelllinien	7
II. Xenogene Tumortransplantationen	11
III. Ziele xenogener Transplantationen	14
1. In vivo Tumormodell	14
2. Unspezifische und spezifische Tumorthherapie im Mausmodell	16
IV. Etablierung von Gliomen in vitro und in vivo	19
C. PROBLEMSTELLUNG	22
D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	23
I. Material und Methoden	23
1. Tumormaterial	23
1.1. Permanente Gliomzelllinien	23
1.2. Tumorzelllinien aus Transplantations- tumoren	23
2. Zellkultivation	24
3. Chromosomenpräparation	24
4. Karyotypisierung	25
5. C-Bandenfärbung bei den Zelllinien P5 und P21	26
6. Versuchstiere	27
7. Induktion von Transplantationstumoren	27
8. Etablierung von Transplantationstumoren in vitro	27

II. Ergebnisse	29
1. Karyotypbestimmung der permanenten Gliomzell- linien	
1.1. 85HG-59	29
1.2. 85HG-63	30
1.3. 85HG-66	34
1.4. 86HG-39	36
1.5. 87HG-31	36
2. Karyotypisierung der aus Transplantaten eta- blierten Zelllinien 85HG-66-T6, T7 und T8	38
3. Specieszuordnung der aus Transplantaten eta- blierten Zelllinien P5 und P21	41
E. DISKUSSION	44
1. Cytogenetische Charakterisierung der permanenten Gliomzelllinien 85HG-59, 85HG-63, 86HG-39 und 87HG-31	44
2. Cytogenetische Charakterisierung der Gliomzelllinie 85HG-66 und der aus den Trans- plantaten etablierten Zelllinien 85HG-66-T6, T7 und T8	51
3. Transplantierbarkeit humaner Gliome	52
F. ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	54
G. LITERATURVERZEICHNIS	58

A. EINLEITUNG

Ein Zusammenhang zwischen Tumorentstehung und Chromosomenveränderungen wurde schon im vergangenen Jahrhundert diskutiert. Ende des 19. Jahrhunderts beobachtete man in Tumorzellen veränderte Chromosomenmuster und Unregelmäßigkeiten in der Zellteilung. BOVERI (1914) vertrat in seiner "Chromosomentheorie maligner Tumoren" die Ansicht, daß Chromosomenverteilungsstörungen die Ursache für eine Tumorentstehung seien. Die molekularen Mechanismen der chemischen Karzinogenese sind bis heute noch nicht völlig geklärt. Allerdings haben experimentelle Untersuchungen zu dem Ergebnis geführt, daß bestimmte Stoffe (z.B. Nitrosamine) zu Produkten umgewandelt werden, die entweder reine alkylierende Substanzen oder elektrophile Reagenzien darstellen (BIRKMAYER, 1986). Karzinogene können zum einen kovalente Bindungen mit den Nucleinsäuren eingehen und zum anderen zwischen die Basen der DNA interkalieren. Dies führt zu einer falschen Basenpaarung mit Weitergabe dieses Fehlers an den neusynthetisierten Strang und einer Fixierung des karzinogenen Effekts.

Als physikalische Karzinogene gelten alle Einflüsse, die physikalisch auf den Organismus einwirken, vor allem ionisierende Strahlen und mechanischer Druck. Ionisierende Strahlen werden absorbiert, die nach Freisetzung von Sekundärelektronen produzierten Ionen treten mit allen Bestandteilen der Zelle in Wechselwirkung und führen zu Modifikationen der Nucleinsäuren.

Als biologische Krebsinduktoren gelten onkogene DNA- und RNA-Viren, die nach Infektion in das Genom der Wirtszellen integriert werden. Die DNA wird zu virusspezifischer m-RNS transkribiert, die daraufhin die Synthese virusspezifischer Proteine codiert. Die viralen Gene können wie auch andere zellu-

läre Gene reprimiert vorliegen und erst durch Einwirkung eines Co-Karzinogens dereprimiert werden. Der Tumorgenese liegt ein Mehrschrittmechanismus zugrunde, der in Initiations-schritte, welche die Zellen zur Tumorbildung prädisponieren und Promotionsschritte, die zu dem unkontrollierten Wachstum führen, eingeteilt wird. Chemische und physikalische Karzinogene sowie Viren können gleichermaßen die Initiation als auch die Promotion einleiten. Dies führt zur Transformation, dem Verlust des ursprünglichen Differenzierungszustandes der Zelle und der Umprogrammierung auf das embryonale Proliferationsprogramm. Molekularbiologisch gesehen werden bei der Dedifferenzierung bestimmte Gene realisiert, die im volldifferenzierten Zustand unterdrückt bleiben (BIRKMAYER, 1984). Das Karzinogen wirkt zum einen direkt am Chromosom als Derepressor von Genen, deren Produkte bei der Zellteilung und Proliferation eine Rolle spielen und zum anderen indirekt, indem es mit Regulatormolekülen in Wechselwirkung tritt, die als Repressoren wirken. Diese Gene, die eine zelluläre Transformation bewirken können, werden Onkogene genannt. In letzter Zeit gelang es, einige dieser Onkogene zu identifizieren (SHAPIRO, 1986, BLIN et al. 1987). Eine normale Zelle ist transformiert, wenn ein oder mehrere Proto-Onkogene zellulären oder viralen Ursprungs in ihr aktiviert werden. Dieses geschieht durch Punktmutation, Amplifikation oder Positionseffekte wie z.B. die reziproke Translokation.

Der Zusammenhang zwischen abnormer Chromosomenstruktur (Translokation, Deletion und Duplikation) und der Aktivierung bestimmter Proto-Onkogene soll anhand der bei vielen Glioblastomen gefundenen mehrfachen Duplikation des Chromosoms Nr. 7 verdeutlicht werden. Das auf diesem Chromosom liegende Proto-Onkogen c-erb B ist maßgeblich an der Stimulierung der Zellteilung normaler Gliazellen beteiligt (SHAPIRO, 1986). Eine

Vervielfachung dieses Chromosoms führt zu vermehrter Expression des Onkogens c-erb B mit der Konsequenz einer erhöhten Zellteilungsrate. Im Gegensatz zu der umfangreichen Literatur über die Chromosomenzusammensetzung von Leukämien und Lymphomen, gibt es nur wenige Arbeiten über eine Karyotypanalyse von malignen Gliomen des Menschen. MARK (1971) konnte zeigen, daß 37 von 50 frisch explantierten Gliomen Stammlinien im diploiden Bereich hatten. Nachdem diese Studie vor dem Einsatz der Giemsa-Bandentechnik im Rahmen der Chromosomenanalyse durchgeführt wurde, konnten von diesem Autor die spezifischen, in numerische und strukturelle Abweichungen involvierten Chromosomen noch nicht zugeordnet werden. Seit der Einführung der Bandentechniken sind verschiedene Arbeiten über Karyotypanalysen nach direkter Präparation von Biopsiematerial und nach Kurzzeitkultur erschienen (YAMADA et al. 1980; AL SAADI et al. 1983; REY et al. 1983). Karyotypanalysen permanenter, etablierter Zelllinien wurden von MARK (1974), REY (1983) und BIGNER et al. (1984) durchgeführt.

Permanente Zelllinien, die aus Hirntumoren des Menschen in vitro etabliert werden, sind bei einer Vielfalt von Studien nützlich. Diese finden insbesondere zum Studium des in vitro Proliferationsverhaltens, der Generationszeit, der Syntheseleistung, der klonalen Variabilität etc. verschiedener Gliomzellen Verwendung. Darüber hinaus können diese Linien zur Testung der Wirkung von Medikamenten bzw. Strahlen herangezogen werden. Da allerdings die in vitro Verhältnisse nicht in jedem Fall den in vivo Bedingungen gleichgesetzt werden können, ist die Untersuchung einiger Parameter nur am Tumortransplantat sinnvoll. Für all diese Überlegungen ist Voraussetzung, daß die kultivierten Tumorzellen die Charakteristika ihres Ursprungstumors so weit als möglich beibehalten. Somit wird die Notwendigkeit einer Chromosomenanalyse tumorigener



Zellkulturen auch nach zahlreichen in vitro/in vivo Wechselpassagen deutlich. Dies umso mehr, als die Bedeutung experimenteller, mit Hilfe des in vivo Tumormodells erzielter Daten im wesentlichen von der genetischen Stabilität der zur Erzeugung von Transplantationstumoren verwendeten Tumورlinie abhängig ist.

B. LITERATURÜBERSICHT

I. Karyotypentwicklung von Gliomzelllinien

Die Karyotypentwicklung von Hirntumoren wurde zumeist an malignen Gliomen beschrieben (BIGNER et al., 1981, 1984, 1986, 1987; MARK, 1971, 1974; MARK et al. 1977). Interessant ist hier die Entwicklung des Karyotyps vom frisch explantierten Originaltumor über die Etablierung als permanente Zelllinie bis zu einer Transplantation in die Maus. Von Bedeutung ist die Stabilität einer Zelllinie, das heißt, ob die passagierten bzw. transplantierten Tumorzellen noch repräsentativ für den Originaltumor sind.

Bei Untersuchungen, die an frisch explantierten Originaltumoren und Kurzzeitkulturen durchgeführt wurden, konnte im allgemeinen eine nahezu diploide Chromosomenzahl mit wenigen strukturellen Abweichungen festgestellt werden (MARK, 1971; RANKIN et al., 1980; SAADI u. LATIMER et al., 1980; SHAPIRO et al. 1981; BIGNER u. MARK, 1984). Die Ergebnisse von Mark (1971) sind auf diesem Gebiet als richtungsweisend anzusehen. Er untersuchte 50 Gliome direkt nach der Explantation und konnte feststellen, daß 37 Astrocytome Stammlinien in der hypodiploiden/hyperdiploiden Region und 38 Astrocytome Markerchromosomen enthielten. MARK (1971) fand zudem, daß die meisten Gliome Seitenlinien im hyperdiploiden, pseudodiploiden, nahe triploiden bis zum hypotetraploiden Bereich hatten. Die Markerchromosomen konnten in dieser Studie, ohne Anwendung der Giemsa-Bandentechnik, nur teilweise zugeordnet werden. Die Resultate von MARK (1971) wurden in den folgenden Jahren von mehreren Autoren bestätigt (SHAPIRO et al., 1981; SAADI u. LATIMER, 1980; YAMADA et al., 1980).

Aufgrund ihrer großen Variation kann man Gliome in der direkten Präparation und nach Kurzzeitkultur in drei Kategorien

einteilen (BIGNER u. MARK, 1984). Die erste Gruppe umfasst Tumoren einheitlicher Zellpopulation mit relativ homogenem, nahezu diploidem Karyotyp, die als einzige Abweichung den Verlust eines der Gonosomen aufweisen. Diese Tumoren bleiben über einige Passagen in der Monolayerkultur stabil, lassen sich aber kaum in vitro propagieren.

In der zweiten Gruppe findet man zum einen Gliome mit gemischten Zellpopulationen, die keine einheitliche Stammlinie aufweisen, sondern viele Stamm-Seitenlinien, die sich untereinander nur in wenigen Chromosomen unterscheiden, und zum anderen Gliome mit einer oder mehreren Seitenlinien im tetraploiden Bereich. Die Tumoren dieser Gruppe stehen aber in enger Beziehung zueinander.

Die dritte Gruppe enthält heterogene Zellpopulationen, die in keiner engen cytogenetischen Beziehung zueinander stehen (BIGNER u. MARK, 1984). Gelingt die in vitro Etablierung als permanente Zellkultur, beobachtet man in zunehmenden Maße eine Herauskristallisierung einer tri-/tetraploiden Seitenlinie, die schließlich dominieren kann und den Platz der Originalstammlinie einnimmt. In den meisten Fällen handelt es sich um eine exakte Verdoppelung des diploiden Chromosomensatzes (BIGNER u. MARK, 1984). Mehrere Autoren sind zu dem Schluß gelangt, daß Zellkulturen nach ihrer Etablierung in vitro eine Entwicklung vom diploiden zum triploiden Chromosomensatz über eine tetraploide Zwischenstufe durchmachen (LEVAN et al., 1958; MAKINO et al., 1965; MARK et al., 1977; REY et al., 1983). Zur Tetraploidie kommt es durch Endoreduplikationen. Bei einer Endoreduplikation handelt es sich um die häufigste Modifikation einer Mitose, die charakteristisch für transformatierte Zellen ist, aber auch in Blut- und Fibroblastenkulturen beobachtet wird. Die Chromosomen verdoppeln sich anstatt nur einmal, wie in einer normalen Mitose, zwei oder

mehrmals ohne Centromerentrennung (diplo-Chromosomen). Durch fraktionierte Chromosomenverluste in den weiteren Passagen kommt es zum Einpendeln in die hypotetraploide/hypertriploide Region. Parallel zu dieser Polyploidisierung wurde ein gradueller Anstieg der Wachstumsrate beobachtet (MARK et al., 1977).

MARK (1971) beobachtete, daß dreiviertel der von ihm analysierten Gliomlinien von Biopsiematerial oder nach Kurzzeitkultur einen Chromosomensatz im diploiden Bereich hatten. Die Erklärung für den Unterschied zwischen Biopsien und Kurzzeitkulturen zum einen und etablierten Zelllinien zum anderen liegt darin, daß das *in vitro* Milieu in besonderem Maße die Entwicklung von tri- bzw. tetraploiden Stammlinien begünstigt. Gliome, die eine solche Stammlinie schon bei der Explantation besitzen, sind solche, die sich am leichtesten den "in vitro Bedingungen" anpassen (MARK et al., 1977). Ein weiterer bedeutender Unterschied zwischen Tumorgewebe in der direkten Präparation und etablierten Zelllinien ist das Auftreten von mehr oder weniger geringfügigen Chromosomenveränderungen in Form von Markerchromosomen. In den späteren Passagen werden zunehmend mehr und immer neue Marker erworben. MARK et al., (1977) entwickelten ein für maligne Gliome typisches Karyotypprofil, das in den folgenden Jahren von vielen Autoren bestätigt wurde. Dieses Profil ist durch einen proportionalen Zuwachs der Chromosomen Nr. 7 und Nr. 10 und eine Veränderung der Chromosomen 4, 22 und oftmals auch 10 und 12 gekennzeichnet (REY et al., 1983; BIGNER u. MARK, 1984). Es handelt sich hierbei um das Phänomen des "non disjunction", d.h. Vermehrung oder Verminderung einzelner Chromosomen, was schließlich zur Bildung einer anaploiden Linie führt.

Als typische, d.h. immer wieder auftauchende Markerchromosomen wurden in den ersten Arbeiten, die sich nach Einführung

der G-Bandentechnik mit der Zuordnung dieser Marker befaßten, zunächst 12q-, 13q-, 14q- gefunden (MARK et al., 1977). Bei diesen drei Markern handelt es sich um eine Deletion des langen Armes (q Arm). Außerdem wurden noch folgende häufig vorkommende Marker gefunden: 11p+ (MARK et al., 1977), 7p+ (SATYA-PRAKASH et al., 1981; BIGNER et al., 1987), 9p- (DISERENS et al., 1981) und 7q- (BIGNER et al., 1986a, 1987).

Zusammenfassend kann man sagen, daß es bei Gliomen, im Gegensatz zu anderen Tumoren, generell keine gemeinsamen Chromosomenanomalien gibt (BIGNER et al., 1984).

Diejenigen Veränderungen aber, die gefunden werden, sind abhängig vom Alter der etablierten Zellkultur. Abgesehen von den Gliomen, die nur Gonosomenverluste aufweisen, kann man bei den übrigen Gliomen davon ausgehen, daß sich zunächst nach der Etablierung in vitro ein Zuwachs von Chromosom Nr. 7 und Verluste Nr. 10 oder Nr. 22 zeigen (BIGNER u. MARK, 1984; YAMADA et al., 1986; REY et al., 1983; AL SAADI u. LATIMER, 1983). Andere häufig vorkommende Aberrationen, wie Zuwachs an Nr. 19, Nr. 20 oder Beteiligung von Chromosom Nr. 1, 6 und 9 bei strukturellen Neuordnungen, sind späte, die anderen überlagernde Veränderungen (BIGNER et al., 1984).

Als charakteristische Chromosomenveränderungen in Gliomen wären schließlich noch das Auftreten von DM's ("double minutes") und HSR's ("homogenously stained regions") zu erwähnen. Sie sind als Ausdruck einer genetischen Amplifikation zu werten. DM's und HSR's sind Chromosomen ohne Centomer (THERMAN, 1986).

Bei Tumoren, die einer medikamentösen Behandlung z.B. mit Methotrexat unterworfen werden, findet im Rahmen einer Resistenzentwicklung eine selektive Genvervielfältigung derjenigen Gene statt, die für die Resistenzbildung verantwortlich sind. In diesem Falle sind auf den DM's bzw. HSR's die Gene,

die das Enzym Dihydrofolatreduktase codieren, lokalisiert. Dihydrofolatreduktase bindet und inaktiviert Methotrexat (THERMAN, 1986).

In den Arbeiten, die sich mit der Beschreibung des Chromosomenmusters von Gliomen nach in vivo Passagen durch die Nacktmaus befassen, wird übereinstimmend festgestellt, daß es sich hier ausschließlich um menschliche Chromosomen handelt (VISFELDT et al., 1971; GIOVANELLA et al., 1974; POVLSEN et al., 1975).

Eine Konstanz der Chromosomenzahl und Retention der spezifischen Marker des Originaltumors wurde ebenfalls beobachtet (FREEDMANN et al., 1976; BRADLEY 1978).

II. Xenogene Tumortransplantation

GREENE (1951) berichtete erstmals über eine erfolgreiche Xenotransplantation humaner Hirntumoren. Er transplantierte Meningiome und Gliome in immunkompetente Ratten und Mäuse (GREENE, 1951, 1953). WILSON (1967) beobachtete nach i.c. Transplantation eines Oligodendroglioms in Sprague-Dawley Ratten ein Tumorwachstum. Beide Autoren konnten allerdings nicht davon ausgehen, daß es sich bei den Transplantationstumoren noch um Gewebe humanen Ursprungs handelte, da keine Chromosomenanalyse durchgeführt wurde (WILSON et al., 1967). Bei der Xenotransplantation nicht neurogener Tumoren des Menschen in immunkompetente Hamster konnten in vivo Hybridisierungen zwischen den Zellen dieser beiden Species beobachtet werden (LAMPERT et al., 1968; GOLDENBERG et al., 1971, 1974; MIHICH, 1974).

Bei der Transplantation verschiedener Karzinome des Menschen in Cortison-behandelte Mäuse wurden lediglich in einem Fall und zwar in der ersten Passage Chromosomen des Menschen ge-

funden (IVERSEN, 1962). Bei den übrigen Transplantaten handelte es sich ausschließlich um Mauschromosomen. Man nahm an, daß das Tumorwachstum im Empfängertier in den weiteren Passagen durch ein Karzinogen im humanen Explantat provoziert werde (IVERSEN, 1962). Die Existenz eines onkogenetischen Faktors, eventuell viralen Ursprungs, der hier eine entscheidende Rolle spielen könnte, wurde auch von anderen Autoren angenommen (POPESCU et al., 1979). Auch hier wurde nach intraembryonaler Transplantation von Melanomen des Menschen in Ratten und Mäuse nur der Chromosomenkaryotyp des Wirtes gefunden (POPESCU et al., 1970).

Mit der Etablierung von immundefizienten Versuchstieren gewannen xenogene Transplantationen wieder Popularität (SHAPIRO, 1979). Zunächst wurden neugeborene, thymektomierte Hamster und Mäuse, die zudem noch bestrahlt wurden, zu Transplantationszwecken herangezogen (COBB, 1974; FRANKS et al., 1975, 1976).

Die thymusaplastische Nacktmaus wurde zum ersten Mal von ISAACSON u. CATTANACH (1962) erwähnt und später eingehend beschrieben (FLANAGAN, 1966). Er erkannte sie als autosomal rezessiv, nannte sie "nude" und führte dafür das symbol "nu" ein (FORTMEYER, 1981). Die "nu/nu" Mutanten sind im Gegensatz zu anderen bekannten nackten Mausmutanten (AL, cv, fs, hl, hr, N, Ra, Sha) von Anfang an haarlos. PANTELOURIS (1968) berichtete, daß bei der homozygoten Nacktmaus kein Thymus zu finden sei. Er wies weiterhin auf die verminderte Zahl von Lymphozyten im peripheren Blut homozygoter Nacktmäuse hin. Obwohl homozygote (nu/nu) und heterozygote (nu/+) Nacktmäuse stark verminderte Leukocyten- bzw. Lymphocytenzellen aufweisen, sind es jedoch lediglich die homozygoten, die als immundefizient angesehen werden. Die bei "nu/nu" vorkommende Abwehrschwäche hat ihre Ursache nicht so sehr in einer geringen

Zahl von Abwehrzellen, sondern ist durch das Fehlen ganz bestimmter Zellgruppen begründet worden (FORTMEYER, 1981).

Die Lymphocytenkomponente der Nacktmaus ist normal ausgebildet (RYGAARD, 1981). Die "nu/nu" Maus weist zwar keine funktionellen T-Zellen auf, sie besitzt jedoch T-Vorläuferzellen ("prethymic-cells"). Das Allel "nu" wirkt sich offensichtlich auch homozygot nicht auf die Bildung der Vorläuferzellen aus. Lediglich aufgrund der Thymusaplasie kommt es nicht zur abschließenden Prägung der T-Lymphocyten (LOOR u. ROELANTS, 1974, 1975; SATO et al., 1976; FORTMEYER, 1981).

"T-cell progenitors", die identisch mit den "natural killer cells" sind (HOLDEN et al., 1978), spielen nach GERSHWIN u. CASTLES (1981) offensichtlich eine bedeutsame Rolle in der der Nacktmaus verbliebenen Abwehr.

Die nu/nu-Maus stellt demnach nicht nur ein wertvolles Modell zur weiteren Erforschung der Thymusfunktion dar, sondern sie ermöglicht auch die in vivo-Züchtung von Tumoren des Menschen ohne Abstoßungsreaktion (FORTMEYER, 1981). Dadurch bedarf es zur Vermeidung oder Verzögerung von Abstoßreaktionen bei Allo- und Xenotransplantationen nicht mehr der Thymektomie oder der immunsuppressiven Behandlung von Versuchstieren.

Über gelungene Transplantationen nicht neurogener maligner Tumoren humanen Ursprungs in die thymusaplastische Nacktmaus wurde wiederholt berichtet (RYGAARD u. POVLSEN 1969; POVLSEN u. RYGAARD, 1971, 1972; GIOVANELLA et al., 1973; DAVIES et al., 1980). Über viele Serienpassagen hinweg wurde konstantes Tumorstadium beobachtet (RYGAARD u. POVLSEN, 1969; POVLSEN u. RYGAARD, 1971, 1972; POVLSEN et al., 1973; GIOVANELLA et al., 1974; SORDAT, 1974). In Chromosomenanalysen dieser Transplantate fanden sich keine Anzeichen für Interspecieshybridisierungen oder einen Specieswechsel. Es handelt sich immer um einen Karyotyp des Menschen (POVLSEN u. RYGAARD, 1971,

1972; VISFELDT et al., 1972; POVLSEN et al., 1973, 1975; GIOVANELLA u. STEHLIN, 1974; DAVIS et al., 1980).

Über eine erfolgreiche subcutane und intracranielle Transplantation von bioptisch gewonnenen Gewebspartikeln aus Gliomen und Meningiomen des Menschen sowie in vitro kultivierten Hirntumorzellen in die thymusaplastische Nacktmaus wurde wiederholt berichtet (RANA et al., 1977; BRADLEY et al., 1978; SHAPIRO, 1979; BIGNER et al., 1981; BULLARD et al., 1981; BIGNER u. MARK, 1984). In den Transplantaten wurde eine Konstanz des menschlichen Chromosomenkaryotyps und des enzymatischen Phänotyps (Glucose-6-Phosphatdehydrogenase Typ B) nachgewiesen (POVLSEN et al., 1975; GIOVANELLA et al., 1978; BRADLEY et al., 1978; FOGH et al., 1980; BIGNER et al., 1981).

III. Ziele xenogener Tumortransplantationen

1. In vivo - Tumormodell

Seit langen Jahren bemüht man sich, ein zuverlässiges und allgemein verbindliches Tiertumormodell zu entwickeln, um sowohl die biologischen Eigenschaften von Hirntumoren (Proliferationskinetik, Syntheseleistung etc.) als auch das Verhalten verschiedener Gliomzellpopulationen unter der Einwirkung von Pharmaka zu studieren.

Bei Hirntumoren können auch mit der besten konventionellen Therapie - Resektion gefolgt von hochdosierten externen Bestrahlungen und Behandlung mit alkylierenden Verbindungen - bisher nur niedrige Überlebensraten erreicht werden (WALKER et al., 1978, 1980).

Um neue immun- und chemotherapeutische Möglichkeiten entwickeln und testen zu können, sind in vitro/in vivo Systeme erforderlich, die den Tumorverhältnissen in primären Gliomen

des Menschen so gerecht als möglich werden und zudem leicht reproduzierbar sind (KAYE et al., 1986).

Viele Tumorsysteme wurden in den letzten Jahren entwickelt. Experimentelle NS-Tumoren wurden durch postnatale Applikation von Resorptiv-Onkogenen mit neurotroper Wirkung (Methylnitrosoharnstoff), wie sie von DRUCKREY et al., (1964) eingeführt wurde, bei verschiedenen Species induziert (STAVROU, 1969a, b, 1970). Auch über diaplazentar erzeugte Tumoren des Nervensystems bei verschiedenen Species wurde wiederholt berichtet (THOMAS u. KERSTING, 1964, 1968; KLEIHUES et al., 1968).

Darüber hinaus wurden auch virusinduzierte neurogene Tumoren vorgestellt (MAHALEY et al., 1977, EDDY et al., 1961, 1962; KIRSCHSTEIN u. GERBER, 1962).

Jedoch sind etablierte Zelllinien humaner Gliome und in thymusaplastische Nacktmäuse transplantierbare Hirntumoren des Menschen den induzierten neurogenen Tumoren vorzuziehen (BIGNER et al., 1984).

Als Beweis der neoplastischen Natur bzw. der Tumorigenität von kultivierten Tumorzellen gilt das progressive Tumorstadium nach deren Transfer in isohistogene Angehörige derselben Species (BIGNER et al., 1981). Da dies bei Tumorzellen des Menschen undurchführbar ist, bietet sich die Nacktmaus als eine akzeptable Alternative an (BIGNER et al., 1981).

Bei serienmäßig subcutan in die Maus transplantierten Tumoren ist eine ansteigende Tumorstadiumsgeschwindigkeit von Transplantation zu Transplantation zu beobachten (SHAPIRO et al., 1979; BULLARD et al., 1981). Infolge der verkürzten Latenzzeit ist erst mit diesem in vivo Tumorsystem ein effektives Arbeiten möglich.

In welcher Form diese erhöhte Tumorigenität Folge einer Selektion bestimmter Zellpopulationen oder eine generelle An-

passung an die Wachstumsbedingungen darstellt, ist noch nicht endgültig geklärt (BULLARD et al., 1981).

Obwohl die intracranielle Transplantation glialer Tumoren den anderen Transplantationsrouten überlegen ist, da man hierbei der tatsächlichen Hirntumorsituation sicherlich gerechter wird, (KAYE et al., 1986; ENGERT et al., 1987), ist die subcutane Tumortransplantation in den meisten Fällen dennoch vorzuziehen. Zum einen vermeidet man hier das durch die Injektion bedingte Hirntrauma, das bei der i.c. Transplantation viele Tiere nicht überleben, zum anderen ist bei dem i.c. Tumormodell weder eine Messung noch ein Vergleich der Tumorgroße möglich. Dies ist allerdings unerlässlich, wenn beispielsweise die Effektivität von Chemotherapeutika auf das Tumorstadium getestet werden soll.

Das subcutane Gliomtransplantat bietet ferner die Möglichkeit, die Sensibilität der Tumorzellen unabhängig von der Blut-Hirn-Schranke zu untersuchen und eine kontinuierliche quantitative Analyse des Tumorstadiums vorzunehmen (BULLARD et al., 1981).

Ein weiteres für die Arbeit mit dem Nacktmausmodell wichtiges Phänomen, ist die Tatsache, daß besonders maligne Tumoren von der Nacktmaus gut toleriert werden und zu einer beachtlichen Größe heranwachsen können (FREEDMAN et al., 1976). Diese Eigenschaft erhöht natürlich die Eignung dieser Mäuse auch als biologische Inkubatoren von Tumoren, die sich in der Zellkultur nur unter bestimmten Bedingungen und großem Aufwand etablieren lassen.

2. Unspezifische und spezifische Tumorthherapie im Mausmodell

Während die Möglichkeiten der Chirurgie und Strahlentherapie weitgehend ausgeschöpft zu sein scheinen, ist der - wenn auch langsame - Fortschritt in den letzten Jahren auf Verbesserun-

gen in der Chemotherapie zurückzuführen (FORTH u. HENSCHLER, 1983). Insbesondere haben neue Erkenntnisse zur Proliferationskinetik und zum Wirkungsmechanismus von cytotoxischen Stoffen zu einer rationalen Anwendung geführt (FORTH u. HENSCHLER, 1983). Aufgrund dieser Entwicklung werden heute durch die Kombination von Wirkstoffen mit unterschiedlichen Angriffspunkten bessere Erfolge bei verminderten Nebenwirkungen erzielt (FORTH u. HENSCHLER, 1983). Der therapeutische Effekt einer Immunchemotherapie mit einem an Ricin oder Cyclophosphamid gekoppelten Antikörper wurde an einem Tumormodell aufgezeigt (WEIL-HILLMANN et al., 1987).

Eine Monotherapie ist unumgänglich, wenn Erfahrungen über Nutzen und Risiko neuer Stoffe gesammelt werden müssen. Die Testung der Wirkung von Chemotherapeutika wird in der Regel bei Transplantationstumoren vorgenommen. Viele Autoren beschreiben am Nacktmausmodell die unspezifische Therapie mit BCNU (1, 3- bis (2-chloräthyl)- 1-nitrosoharnstoff) und CCNU (1- (2- chloräthyl)- 3- cyclohexyl- 1-nitrosoharnstoff), die zu den alkylierenden Verbindungen gehören (LEVIN, 1981, 1985; EDWARDS et al., 1980; BLOOM, 1982; GREIG, 1984, 1987). Bei diesen Verbindungen handelt es sich um phasenunspezifische cytotoxische Substanzen mit hoher Reaktionsfähigkeit mit vielen Zellbestandteilen und in jedem Stadium des Zellzyklus (FORTH u. HENSCHLER, 1983). Sie bilden die Basis der derzeitigen chemotherapeutischen Behandlung von Hirntumoren (GREIG, 1987).

SHAPIRO, et al., (1984, 1986a) stellten bei Gliomzelllinien eine karyotypabhängige unterschiedliche Sensibilität gegenüber BCNU fest. Diploide Zelllinien kristallisierten sich als resistent gegenüber BCNU heraus, hyperdiploide hingegen als sensibel. Zelluläre Resistenz gegenüber BCNU korreliert mit der Chromosomenzahl in der diploiden Region (35 bis 57 Chro-

mosomen pro Zelle). Zellen mit mehr als 60 Chromosomen reagieren hingegen sensibel. Schnell proliferierende Zellen (tri- bzw. tetraploide) erwiesen sich im Vergleich zu langsam wachsenden als sensibler gegenüber Chemotherapeutika. Auch BIGNER et al., (1984) stellten bei Tumoren mit diploidem Chromosomensatz ein langsameres Wachstum fest als bei Tumoren mit einer Dominanz der tri- bzw. tetraploiden Chromosomenzahl. Darüber hinaus konnte auch hier eine unterschiedliche Reaktivität gegenüber Chemotherapeutika in vivo aufgezeigt werden. Außer alkylierenden Verbindungen werden in der Tumorthherapie auch Folsäureantagonisten, sog. Antimetaboliten, wie Methotrexat und Aminopterin eingesetzt (WILSON, 1967).

Ein großer Nachteil der unspezifischen Tumorthherapie ist der, daß wirkungsvolle Verbindungen nicht nur für neoplastische Zellen sondern in der Regel auch für normal proliferierende Zellen toxisch sind (SELA u. HURWITZ, 1987). Eine selektive Zerstörung der Tumorzellen dürfte auch durch eine Koppelung von Chemotherapeutika an monoklonale Antikörper zu erreichen sein (SELA u. HURWITZ, 1987). Die Koppelung der Chemotherapeutika erfolgt mittels "spacer", bei denen es sich um Makromoleküle verschiedenster Art handelt.

Bislang wurden erfolgreich monoklonale Antikörper an Antibiotika (Daunomycin, Adriamycin, Mitomycin und Bleomycin), Pyrimidinanaloga (Fluorodeoxyuridin, Cytosin, Arabinosid), Folsäureanaloga (Aminopterin und Methotrexat), Vinca Alkaloide (Vinblastin und Vincristin) sowie an verschiedene alkylierende Verbindungen (SELA u. HURWITZ, 1987) gekoppelt. Auch in der Erprobung des Einsatzes radioaktiver markierter Antikörper mit dem Ziel einer Immundiagnostik bzw. Immuntherapie von Tumoren sind bereits erste Ansätze zu verzeichnen (EPENETOS et al., 1982, 1985; STAVROU et al., 1985a, b, 1986).

IV. Etablierung von Gliomen in vitro und in vivo

Die in vitro Etablierungsrate maligner Gliome ist niedriger als bei nicht neurogenen Tumoren (BIGNER et al., 1987). Die Angaben über den Prozentsatz der Etablierungsrate sind nicht einheitlich. Sie rangieren in der Größenordnung von 25% (BIGNER et al., 1981), 50% (BIGNER et al., 1984) und 30 - 40% (PONTEN, 1975; BIGNER et al., 1987a). Gliome mit geringen chromosomalen Veränderungen, die den diploiden Chromosomensatz beibehalten und lediglich eine gonosomale Abweichung zeigen, gehören zu den Zelllinien, die sich in vitro kaum etablieren lassen (BIGNER et al., 1984). Gliome des Menschen, die in der Zellkultur durch einen konstanten diploiden Chromosomensatz gekennzeichnet sind, stellen ihre Proliferation bereits nach der 12. bis 16. Passage ein (RANKIN et al., 1980).

Für eine erfolgreiche in vitro Etablierung ist eine Adaption des Tumors an das Zellkulturmilieu notwendig (BIGNER et al., 1984). Faktoren, wie Zusammensetzung des Mediums, Technik der Zellkultivation, Temperatur u.a. spielen hier eine entscheidende Rolle.

Zellen in Primärtumoren und früheren Passagen sind in starkem Maße den Einflüssen einer Selektion ausgesetzt. Eine permanente Zelllinie enthält im Gegensatz zum Ursprungstumor nur noch eine bestimmte Zellpopulation (BIGNER et al., 1984). Dies ist nicht als Selektion einer präexistenten kleinen Population zu werten, sondern als "in vitro" Evolution, die mit einer Chromosomenverdoppelung zwischen der 12. und 30. Passage einhergeht (BIGNER et al., 1984; MARK, 1974; MARK et al., 1977).

Ein Wandel in der "Ploidie", in der Regel auf das $4n$ Niveau, vor einer bestimmten kritischen Anzahl von Passagen, ist der

entscheidende Schritt für eine in vitro Etablierung. Dies bedeutet, daß für Gliome eine Verdoppelung des diploiden Chromosomensatzes für das Überleben in der Langzeitkultur notwendig ist (BIGNER et al., 1987).

Auch die Angaben über die "in vivo" Etablierungsrate sind recht unterschiedlich. Nach einigen Autoren wachsen 50% der Transplantate in thymusaplastischen Nacktmäusen an (GIOVANELLA et al., 1974; BRADLEY et al., 1978; BULLARD et al., 1981). Andere geben höhere (BIGNER et al., 1981) oder niedrigere Zahlen an (ROUSSEAU-MERCK et al., 1985). Hierbei ist das unterschiedliche Ausgangsmaterial der einzelnen Untersucher zu berücksichtigen. Darüber hinaus sind nicht nur Art und Herkunft der transplantierten Tumoren bzw. die angewandten Techniken von Bedeutung, sondern auch genetische Einflüsse, Geschlecht, Alter und Immunstatus des Rezipienten massgebend (FORTMEYER, 1981). Der Transplantationserfolg ist bei hochgradig anaplastischen, schnell wachsenden Tumoren am größten (SHARKEY et al., 1978; BASTERT et al., 1981).

Aus Metastasen stammende Tumorproben weisen auf Nacktmäusen eine signifikant höhere Angehrate auf als solche aus Primärtumoren (SHARKEY et al., 1978; FOGH et al., 1981; FORTMEYER, 1981). Dies trifft auch für Material aus Zellkulturen im Vergleich zur direkten Tumorübertragung zu (KAMEYA et al., 1977; SHARKEY, 1978). Etablierte Zellkulturen stellen bereits ein positiv selektiertes Transplantationsmaterial dar (FORTMEYER, 1981). Die beste Erfolgsquote erzielt man bei Transplantationen in sehr jungen Tieren und bei intracraniellen Transplantationen (FORTMEYER, 1981).

"Nu/nu"-Mäuse sind soweit immundefizient, daß bereits gefäßangeschlossene Transplantate nicht mehr abgestoßen werden (TOGUNAGA u. YAMAMOTO, 1977). Immunologische Faktoren spielen hier jedoch für das Angehen des Transplantates eine wichtige

Rolle (FORTMEYER, 1981). Die Wirkung von "natural killer cells" (NK-Zellen), die aufgrund der Thymuslosigkeit der Nacktmaus nicht in T-Lymphocyten überführt werden können, ist der Grund für das Nichtangehen vieler Tumoren auf "nu/nu"-Mäusen (FORTMEYER, 1981). Dies betrifft gleichermaßen chemisch- und virusinduzierte Tumoren (BULTON et al., 1977; REID u. SHIN, 1978; KIM et al., 1981).

Die Effektivität von NK-Zellen der Nacktmaus kann mittels bakterieller Adjuvantien gesteigert werden (TOGUNAGA u. YAMAMOTO, 1977; HOLDEN et al., 1978; BALDWIN u. PIMM, 1981). Andererseits läßt sich ihre Wirkung durch Cytostatika (HOLDEN et al., 1978) und andere immunsuppressive Maßnahmen, wie Bestrahlung oder Gabe von Anti-Interferon (REID et al., 1981), supprimieren. Eine von Tumor zu Tumor unterschiedliche Mindestzahl von Zellen ist Voraussetzung für die Induktion von Transplantationstumoren (KINDRED u. WECHSLER, 1978), die nach einer Adaptionszeit in drei Phasen abläuft (SHIN, 1977). Voraussetzung für das Einsetzen progressiven Wachstums ist jedoch das Vorhandensein angiogener Faktoren, die offensichtlich auch von neoplastischen Zellen sezerniert werden (FOLKMANN et al., 1971; GIOVANELLA u. STEHLIN, 1974; GIOVANELLA u. FOGH, 1978; REID u. SHIN, 1978).

C. PROBLEMSTELLUNG

In vorausgegangenen Publikationen wurde die Karyotypentwicklung humaner Gliome vom explantierten Originaltumor bis zu einer in vitro Etablierung als permanente Zelllinie mit Hilfe der Giemsa-Bandenfärbung beschrieben. Diese erlaubt eine genaue Erfassung von Chromosomenaberrationen und Zuordnung von Markerchromosomen. Arbeiten, die sich mit der Transplantation von Gliomzelllinien humanen Ursprungs in die thymusaplastische Nacktmaus befassen, sind allerdings selten. In der Literatur wird von Karyotypanalysen transplantabler Tumoren berichtet, jedoch beschränken sich die Aussagen lediglich auf eine Speciesklassifizierung als Maus- bzw. Menschchromosomen. Mit Hilfe der Giemsa-Bandenfärbung wurden Xenotransplantate glialer Tumoren des Menschen aus Serienpassagen durch die Nacktmaus bisher noch nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit sollte sein, permanente Gliomzelllinien zu karyotypisieren, in thymusaplastische Nacktmäuse zu transplantieren, die Explantate wieder in vitro zu kultivieren und die daraus etablierten Zelllinien zu karyotypisieren. Mit Hilfe der Giemsa-Bandentechnik sollte die genetische Stabilität dieser Zelllinien untersucht werden. Darüber hinaus sollten Chromosomenanomalien und strukturelle Aberrationen erfasst und die Markerchromosomen identifiziert werden.

D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Material und Methoden

1. Tumormaterial1.1. Permanente Gliomzelllinien

Es wurden Gliomzelllinien aus Hirntumoren humanen Ursprungs karotypisiert. Die Primärtumoren wurden nach den WHO-Richtlinien wie folgt klassifiziert:

Tumor Nr.	Diagnose	Bezeichnung der Zellkultur
1. N59/85	Glioblastom mit sarkomatösem Anteil	85HG-59
2. N63/85	Astrocytom Grad II	85HG-63
3. N66/85	Astrocytom Grad III	85HG-66
4. N39/86	Glioblastom	86HG-39
5. N31/87	Astrocytom Grad III	87HG-31

1.2. Tumorzelllinien aus Transplantationstumoren

Folgende, aus Transplantaten etablierte Tumorzelllinien wurden karyotypisiert:

Transplantations-Tumor Nr.	Diagnose	Bezeichnung der Zelllinie
N66/85-T6	Astrocytom Grad III	85HG-66-T6
N66/85-T7	Astrocytom Grad III	85HG-66-T7
N66/85-T8	Astrocytom Grad III	85HG-66-T8
N50/86	Astrocytom Grad III	P5
N52/86	Astrocytom Grad III	P21

2. Zellkultivation

Die Gliomzelllinien wurden in Einmalplastikflaschen (Nunc^R, Kamstrup) bei 37°C im offenen System mit 5% CO₂-Begasung gezüchtet. Als Nährmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Scotland 074-2100), welches pro Liter 10% fetales Kälberserum (FKS, Flow Lab., Bonn), 100.000 I.E. Penicillin G, 0.1 g Neomycin und 0.1 g Streptomycin enthielt. Dichtgewachsene Zellkulturen wurden mit einer STV-Lösung (100 ml Saline 10-fach, 25 ml einer 1.25 %igen Trypsinlösung, 50 ml einer 1 %igen Aqua Versene-Lösung, Aqua bi-dist. ad 1000 ml) vom Kulurgefäß abgelöst und je nach Bedarf im Verhältnis 1:2 bis 1:5 geteilt.

Um vor einer Chromosomenpräparation eine zusätzliche Anreicherung von Mitosen zu erhalten, wurden die Zellen 1 bis 2 Tage zuvor gesplittet, um die Zellkultur stärker zu synchronisieren.

3. Chromosomenpräparation

Ein bis drei Stunden vor der Chromosomenpräparation wurde der Zellkulturflasche 0.4 µg/ml Medium Colcemid (Ciba) steril zugesetzt. Die Dauer der Einwirkungszeit variierte je nach Tumor und diente einer Blockierung der Zellteilung in der Metaphase und somit einer Anreicherung von Mitosen. Die Gewinnung von Mitosen erfolgte unter sterilen Bedingungen, um den verbliebenen Zellrasen für neue Präparationen weiter kultivieren zu können. Der Überstand der Kulturflasche wurde in ein spitzen Zentrifugenröhrchen gegeben. Pro Flasche gab man 1 ml PBS-Trypsin (0.25 %ig) und 4 ml PBS-A steril hinzu. Mit Hilfe eines inversen Mikroskopes wurde dann die Ablösung der Mitosen kontrolliert, die bei Bedarf mit vorsichtigem Klopfen unterstützt wurde. Bevor sich der Zellrasen abkugelte, wurde der Flascheninhalt gleichfalls in das Zentrifugenglas über-

führt. Anschließend spülte man 1 bis 2 mal mit Medium nach, gab dieses Medium ebenfalls in das Zentrifugenglas und zentrifugierte 10 min bei 200 xg. Der Überstand wurde abgesaugt. Es folgte eine Hypotoniebehandlung mit 1 ml 0.5 %iger KCl mit anschließender Inkubation bei 37°C. Die optimale KCl-Zeit variierte je nach Tumor zwischen 10 Minuten und einer halben Stunde. Es wurde wieder bei 200xg 8 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Die Hypotoniebehandlung ermöglichte durch die beträchtliche Volumenzunahme der Zelle ein Auseinanderrücken der Chromosomen der in der Mitose befindlichen Zellen und somit eine bessere Chromosomendarstellung. Die Fixierung erfolgte in einem frisch angesetzten Gemisch aus Eisessig/Methanol 1:3 (Carnoy's Fixativ). Die Fixierungszeit betrug 45 Minuten bei 4°C. Es wurde nochmals 15 Minuten zentrifugiert und das Fixativ gewechselt. Das Zellsediment wurde in einem kleinen Volumen Fixierlösung resuspendiert und in eine Pipette aufgesaugt. Die fixierten Tumorzellen wurden auf einen mit eisgekühltem destillierten Wasser benetzten Objektträger aufgetropft und der Objektträger anschließend luftgetrocknet.

4. Karyotypisierung

Die differentielle Färbung der Chromosomen, das "Bändern" ("banding") stellt einen wichtigen Faktor der Karyotypanalyse dar.

Bei der Durchführung der Giemsaendenfärbung wurden die Präparate mit einer Trypsinlösung vorbehandelt. Dies setzte eine Stabilität der Präparate voraus, die erst nach ca. 4 Tagen Lufttrocknung erreicht werden konnte. Man tauchte die Objektträger 30 sec in eine 0.0125%ige Trypsinlösung (Trypsin Difco-0152-15-9). Nach Waschen in PBS-A wurden die Präparate kurz in eine Alkoholreihe von 70%, 80% und 90%igem Alkohol

getaucht und 6 min in einer 2.5 %igen Giemsalösung gefärbt (2,5 ml Giemsalösung Merck, 30 ml Sörensenpuffer pH 6.8 ad 100 ml Aqua dest.). Anschließend wurden die Präparate in Aqua dest. gespült und getrocknet. Nach Eintauchen in Xylol wurden sie mit Eukitt eingeschlossen.

Von jeder untersuchten Tumorkultur wurden mindestens 30 Mitosen mit Immersionsoptik photographiert (Zeiss Photomikroskop II, Neofluar 100/1,25, Agfa-Ortho Film) und ausgewertet. Die Chromosomen konnten mit Hilfe der Bandenfärbung auf Verluste und Strukturveränderungen untersucht werden.

5. C-Bandenfärbung bei den Zelllinien P5 und P21

Bei den Tumorzelllinien P5 und P21 ergab sich im Rahmen einer genauen Spezieszuordnung die Notwendigkeit, neben einer Giemsabandenfärbung zusätzlich noch eine Färbung der C-Bänder (Centromeren) durchzuführen. Die C-Bänder treten im konstitutiven Heterochromatin auf, das sich bei Säugern vor allem in der Centromerenregion befindet. 3 bis 8 Tage alte Präparate wurden 10 min in 1N HCl belassen. Die HCl-Behandlung bewirkte eine Depurinisierung und infolge davon eine Instabilisierung der DNA. Nach Spülen mit Aqua dest. verblieben die Präparate 10 min bei Zimmertemperatur in einer 5 %igen, frisch angesetzten und filtrierten Bariumhydroxydlösung ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8\text{H}_2\text{O}$). Anschließend wurden die Präparate gut gespült und 60 min bei 60°C in eine SSC-Pufferlösung gegeben (SSC-Pufferlösung: 0.30 M NaCl und 0.03 M Trinatriumcitrat, Merck). Schließlich wurden die Präparate 60 bis 90 min in 5%iger Giemsa-Lösung gefärbt. Durch Behandlung mit Bariumhydroxyd wurde die DNA denaturiert. Das Verbleiben in der SCC-Salzlösung bewirkte eine differentielle Extraktion der DNA aus dem Euchromatin.

6. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 8 bis 9 Wochen alte NMRI-nu/nu Nacktmäuse (thymuslos und Phagocytose-defekt) beiderlei Geschlechts. Futter und Trinkwasser wurden ad libitum angeboten. Als Standarddiät wurde Altromin-1410^R, eine spezielle Nacktmausdiät, gegeben. Das Trinkwasser wurde mit HCl auf einen pH von 2.5 angesäuert (FORTMEYER, 1981).

7. Induktion von Transplantationstumoren

Von den Zelllinien 85HG-59, 85HG-63, 85HG-66, 86HG-39 und 87HG-31 sollten subcutane Transplantationstumoren durch Inoculation von $1 - 10 \times 10^6$ Gliomzellen in NMRI-nu/nu Mäuse gewonnen werden. Eine anschließende Chromosomenanalyse sollte Aufschluß darüber geben, ob das Transplantat noch repräsentativ für den Originaltumor ist.

Dichtbewachsene Zellkulturflaschen wurden mit STV trypsiiniert. Nach Ablösung des Zellrasens überführte man die Zellen mit Medium (HCM) in Zentrifugenröhrchen und zentrifugierte bei 200 xg. Nach Zählung mit einem elektronischen Zählgerät (Coulter Electronics LTD, Harpenden, England) resuspendierte man die Zellen in 0.5 ml Medium. Pro Maus wurden in der Regel 10×10^6 Zellen mit einer No 18 Injektionsnadel in die seitliche Brustwand injiziert.

8. In vitro-Etablierung von Zelllinien aus Transplantationstumoren

Nach durchschnittlich 3 bis 4 Wochen entwickelten sich im positiven Fall etwa kirschgroße Tumoren ohne sichtbare Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Versuchstiere. Die Tiere wurden euthanasiert und die Tumoren steril entnommen. Nach Entfernen von Haut mit Bindegewebe wurde der Tumor in

eine sterile Petrischale mit 1.25%iger Trypsinlösung gelegt und mit einem Skalpell zerkleinert.

Mit einer entsprechenden Menge sterilem Mediums (HCM), das zur Neutralisierung der Trypsinlösung diente, wurden die Tumorstückchen in ein steriles Zentrifugenglas überführt und bei 200 xg 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert und in eine Gewebekulturflasche überführt. Die Inkubation erfolgte im offenen System (5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit).

II. Ergebnisse

Die Chromosomen 1-22 werden anhand ihrer Länge und der Lage ihres Centromers in 7 Gruppen von A bis G unterteilt. Die Symbole "p" und "q" dienen zur Bezeichnung des kurzen bzw. des langen Armes eines Chromosoms. Darüber hinaus kann jedes Chromosom anhand seiner Banden in bestimmte Segmente unterteilt werden.

Ein Bandendiagramm gemäß der Pariser Nomenklatur (1971) und des ISNC 1985 ("International System for Human Cytogenetic Nomenclature") ermöglicht eine genaue Lokalisierung der Bruchstellen eines Chromosoms. "7q-del (2.1.→ter)" bedeutet beispielsweise, daß eine Deletion am langen Arm des Chromosoms Nr. 7, am sog. "Orientierungspunkt" ("landmark") 2.1. erfolgt ist; →ter weist darauf hin, daß sich der Bruch auf das gesamte, unterhalb dieses Punktes liegenden Segment bezieht. Das Symbol "mar" wurde für nicht identifizierbare Markerchromosomen verwendet.

1. Karyotypbestimmung der permanenten Gliomzelllinien

1.1. 85HG-59

Diese Gliomzelllinie wurde aus einem Glioblastom mit sarkomatösem Anteil etabliert. Die Karyotypisierung erfolgte in der 176. in vitro Passage. Es wurden von 5 Mitosen Karyogramme erstellt und in 30 Mitosen die Anzahl der Chromosomen ermittelt. Die Klassifizierung des Karyotyps erfolgte bei allen Gliomzelllinien anhand des ISNC 1985, welches auf den Ergebnissen der cytogenetischen Konferenz 1980 in Paris beruht. Folgender Karyotyp wurde gefunden (Abb. 1): 61-66, XXY, A M1, A 3p-,del(p2.1→ter), C6p-,del(p1.2→ter), C6p+,t(+6p→ter::?), C7p-,del(p21.2→ter, C7q-,del(2.2→ter), C8q+,t(+8p→ter::?), C8q-,del(q21.2→ter, C10p-,del(p1.5→ter), D14p+,t(+14p→ter::6p1.2→ter), -E18,mar 1.

Es handelt sich hier um eine Gliomzelllinie mit einem Chromosomensatz im hypotriploiden Bereich mit Chromosomenzuwachs vor allem in der Gruppe C (Chromosomen 6, 7, 10 und 11). "M1" bedeutet, daß das Chromosom der Nr. 1 kleiner ist als ein normales Chromosom Nr. 1. Der Grund ist eine Deletion an den Terminalsegmenten beider Arme. Ferner liegt eine Nullisomie der Chromosomen E 18 vor. Nach der Transplantation dieser Gliomzelllinie in die thymusaplastische Nacktmaus (NMRI-nu/nu) konnte kein Tumorwachstum beobachtet werden.

1.2. 85-HG-63

Diese Gliomzelllinie wurde aus einem Astrocytom Grad II etabliert. Die Karotypenanalyse erfolgte in der 168. in vitro Passage. Es wurden von 5 Mitosen Karyogramme erstellt und in 30 Mitosen die Anzahl der Chromosomen ermittelt. Es handelt sich hier um folgenden Karyotyp (Abb. 2):

78-85, XX, C7q-,del(3.2→ter), C9p11q,t(+9p→ter::11q1.4→ter), C10p-,del(pl.3→ter), C12p-,del(p→ter11.2::p1.3→ter), D13p+,t(+13p→ter::?), D15q+,t(+15q→ter::?), D15q+,t(+15q→ter), F19p+,t(+19p→ter::?), mar 1, mar 2, mar 3.

85-HG-63 hat eine Chromosomenzahl im hypertriploiden bis hypotetraploiden Bereich. Auffallend ist der Zuwachs an Chromosomen der Gruppe C. Man findet hier 5 Chromosomen Nr. 7, 6 Chromosomen Nr. 8 und 5 Chromosomen Nr. 9. Darüber hinaus beobachtet man zum einen einen Zuwachs in der Gruppe D (Chromosom Nr. 13 und 15 liegen 4 bzw. 5 mal vor) und zum anderen in der Gruppe F. Es finden sich hier 5 Chromosomen Nr. 20. Eines der Gonosomen, das Y Chromosom, fehlt in allen Mitosen. Bei dem Markerchromosom 12p- liegt wahrscheinlich eine nicht reziproke Translokation vor. Das Segment zwischen 12p11.2 und 12p1.3 fehlt.

Nach einer Transplantation dieser Gliomzelllinie in die Nacktmaus (NMRI nu/nu) konnte ebenfalls kein Tumorwachstum beobachtet werden.

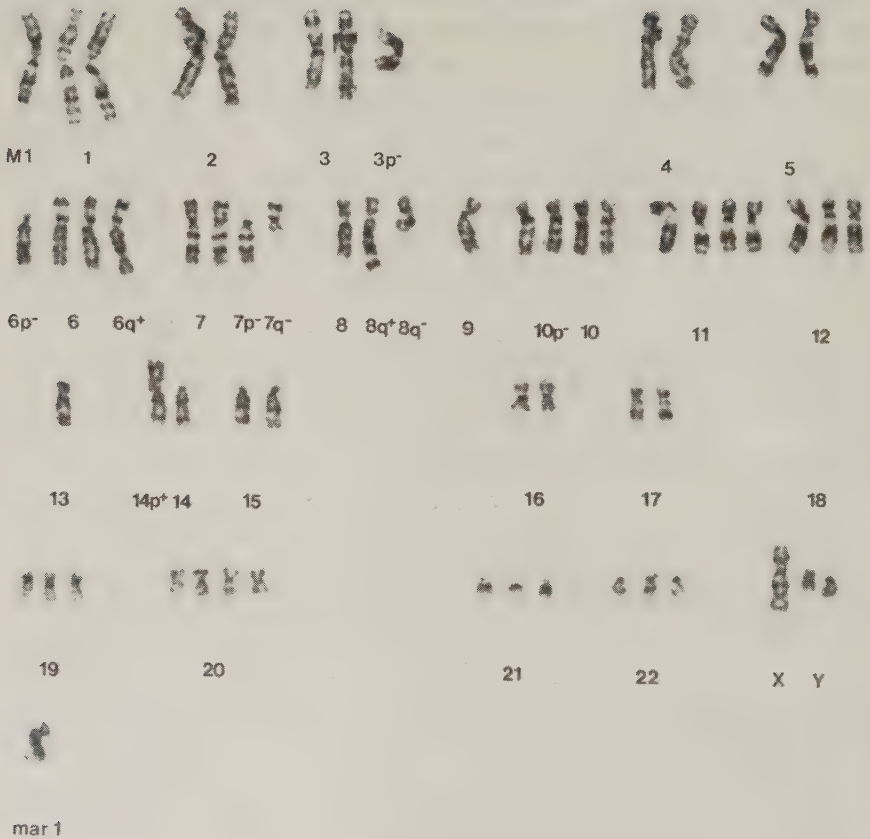


Abb. 1: Karyotyp der aus einem Glioblastom mit sarkomatösem Anteil etablierten 85HG-59 Zelllinie (176. in vitro Passage). Neben den Markerchromosomen M1, 3p⁻, 6p⁻, 8q⁺ und 10p⁻, die in allen untersuchten Mitosen gefunden wurden, enthält diese Zelle zusätzlich die Marker 6q⁺, 7p⁻, 7q⁻, 8q⁻ und 14p⁺.



Abb. 2: Karyotyp der aus einem Astrocytom Grad II etablierten 85HG-63 Zelllinie (168. in vitro Passage). Als gemeinsame Markerchromosomen aller Mitosen dieser Linie wurden 7q-, 7q+, 9p+, 10p-, 12p-, 13q+ und 19p+ beobachtet. Die abgebildete Mitose enthält darüber hinaus zwei 15q+ Marker.

1.3. 85-HG-66

Der Ursprungstumor dieser permanenten Gliomzelllinie war ein Astrocytom Grad III. Die Analyse des Karyotyps erfolgte in der 163. in vitro Passage. Es wurden von 10 Mitosen Karyogramme erstellt und in 50 Mitosen die Chromosomenzahl ermittelt. Es fand sich folgender Karyotyp (Abb. 3):

80-86, XXY, Ai(1q1.11→ter), C6p+,t(6p→ter::?), C7q-,del(q2.1→ter), C8q-,del(q11.2→ter), C10p 7q t(+10p→ter::7q2.1→ter), D14q+, t(14q→ter::?), D14q+,t(+14q→ter::?)

Bei dieser Gliomzelllinie wurde ein Chromosomensatz im hypertriploiden bis hypotetraploiden Bereich gefunden. Die Gruppe A enthält ein Isochromosom (i), welches den Chromosomen Nr. 1 zuzuordnen ist. Dieses Isochromosom hat zwei homologe Arme. Es ist durch einen Bruch im Centromer und der darauffolgenden Duplikation des q Armes entstanden. Darüber hinaus läßt sich zum einen ein überdurchschnittlicher Zuwachs des Chromosoms Nr. 7 (Gruppe C) und zum anderen der Chromosomen Nr. 19, 20, 21 und 22 (Gruppe F und G) feststellen.

Die Gliomzelllinie 85HG-66 wurde bisher achtmal erfolgreich in die Nacktmaus (NMRI nu/nu) transplantiert und die Transplantate wieder in vitro etabliert.



Abb. 3: Karyotyp der aus einem Astrocytom Grad III eta-
 blierten 85HG-66 Zelllinie (163. in vitro Passage).
 Die abgebildete Mitose ist durch das Markerchromosom
 14q+ charakterisiert. Ferner enthält sie die auch in
 allen anderen Mitosen gefundenen Marker i(1q), 6p+,
 7q-, 8q-, 10p+ und 14q+.

1.4. 86-HG-39

Die Gliomzelllinie 86-HG-39 wurde aus einem Glioblastom in vitro propagiert. Die Analyse des Karyotyps wurde nach der 27. in vitro Passage vorgenommen. Es wurden von 5 Mitosen Karyogramme erstellt und in 30 Mitosen die Chromosomenzahl ermittelt. Man fand eine Stammlinie im hypodiploiden bis diploiden Bereich mit hypotetraploiden bis tetraploiden Seitenlinien. Die folgende Karyotypisierung (Abb. 4) bezieht sich auf die Stammlinie: 38-46, XY, C9p+,t(+9p→ter:?:?),-C 13, mar 1, mar 2, mar 3

Bei dieser Linie wurde nur ein Markerchromosom, 9p+, gefunden. Zudem liegt eine Nullisomie der Chromosomen D13 vor, die sich allerdings nicht in allen Mitosen bestätigt.

Eine Transplantation dieser Gliomzelllinie in die Nacktmaus wurde bisher noch nicht vorgenommen.

1.5. 87-HG-31

Die Gliomzelllinie wurde aus einem Astrocytom Grad III etabliert. Anhand von 30 Giemsa-gefärbten Mitosen wurde die Anzahl der Chromosomen in der 24. in vitro Passage ermittelt.

Tab. 1: Anzahl der Chromosomen bei 30 ausgewerteten Mitosen

1.Anzahl der Mitosen	3		5		10	3	5		4
2.Chromosomenzahl	72	73	74	75	76	77	78	79	80

Die Gliomzelllinie 87-HG-31 besitzt somit einen Chromosomensatz im hypertriploiden Bereich. Eine Karyotypisierung dieser Zelllinie wurde bisher noch nicht vorgenommen.

Die Gliomzelllinie 87-HG-31 wurde bislang noch nicht transplantiert.



Abb. 4: Karyotyp der aus einem Glioblastom etablierten 86HG-39 Zelllinie (27. in vitro Passage). Bei allen untersuchten Mitosen konnte nur ein Markerchromosom (9p+) gefunden werden.

2. Karyotypisierung der aus Transplantaten etablierten

Zelllinien 85HG-66-T6, T7 und T8

Die permanente Gliomzelllinie 85HG-66 wurde in der 125. in vitro Passage in die thymusaplastische Nacktmaus (NMRI nu/nu) transplantiert. Die erste Karyotypisierung der aus dem Transplantat wieder in vitro etablierten Zelllinie erfolgte nach der 6. in vitro/in vivo Passage. Karyotypanalysen konnten in der 31., 46., 61. und 72. in vitro Passage vorgenommen werden. Von 10 Mitosen wurden Karyogramme erstellt und in 50 Mitosen die Chromosomenanzahl bestimmt. Folgender, für alle analysierten Passagen repräsentativer Karyotyp wurde gefunden (Abb. 5): 68-76, XXY, Ai (1q1.11→ter), C7q-,del(q2.1→ter), Cp7q,t(+10p→ter::7q2.1→ter), D14q+,t(+14q→ter::?)

Es handelt sich hier um einen Karyotyp des Menschen. Der Chromosomensatz liegt im triploiden bis hypertriploiden Bereich. Vergleicht man den Ursprungstumor, 85HG-66 mit dieser aus dem 6. Transplantat etablierten Zelllinie, so fällt zunächst ein Chromosomenverlust auf. Dieser erstreckt sich vor allem auf die Gruppen D, F und G. Betroffen sind hier vor allem die Chromosomen Nr. 14 und 15 (Gruppe D) sowie 20 (Gruppe F) und 22 (Gruppe G). Zudem ist der Verlust eines der zuvor in allen Mitosen zweifach vorliegenden X Chromosomen zu beobachten. Darüber hinaus läßt sich eine weitgehende Konstanz der Markerchromosomen bemerken. Einige Marker, wie 6p+, 8q- und einer der 14q+ Marker, sind verlorengegangen. Das Auftreten neuer Markerchromosomen wurde hingegen nicht beobachtet.

Bei den durch weiterführende Transplantationen der 85HG-66-T6 Zelllinie in die Nacktmaus gewonnenen Transplantaten ließen sich keine abweichenden Befunde erheben. Sowohl bei 85HG-66-T7 als auch bei 85HG-66-T8 stellte man einen triploiden bis hypertriploiden Chromosomensatz fest. Die Markerchromosomen,

die bereits die Zelllinie 85HG-66-T6 charakterisierten, wurden beibehalten.



Abb. 5: Karyotyp der aus einem Transplantat etablierten 85HG-66-T6 Zelllinie in der 61. in vitro Passage. Gegenüber der Ursprungszelllinie ist bei dieser Kultur der Verlust der Markerchromosomen 6p⁺ und 8q⁻ feststellbar.

3. Specieszuordnung der aus Transplantaten etablierten Zelllinien P5 und P21

Bei den Ursprungstumoren der Zelllinien P5 und P21 handelt es sich in beiden Fällen um ein Astrocytom Grad III. Die Tumortransplantate wurden nicht in vitro etabliert, sondern man transplantierte frisch explantiertes Biopsiematerial in die Nacktmaus (NMRI nu/nu). Beide Zelllinien exprimierten kein HLA Antigen der Klasse I, somit ergaben sich Zweifel, ob es sich hier überhaupt noch um Tumorzellen humanen Ursprungs handelte.

Bei der Chromosomenpräparation zeigte sich, daß auf den Präparaten zwar sehr viele Mitosen vorlagen, aber nur sehr wenige für eine Analyse überhaupt geeignet waren. Dies ist eine Begleiterscheinung, die bei Präparationen von Mischgewebstumoren häufig beobachtet wird. Nach einer G-Bandenfärbung fand man bei beiden Zelllinien zum einen eine Chromosomenzahl zwischen 43 und 46 und zum anderen Mitosen mit mehr als 90 Chromosomen. Diese Präparation ließ jedoch keine klare Specieseinordnung zu. Einerseits konnte man Chromosomen des Menschen bestimmen, andererseits lagen aber sehr viele kleine, akrozentrische Chromosomen vor, die gleichfalls Mauschromosomen hätten sein können. So wählte man eine andere Methode der Färbung, die C-Bandenfärbung.

Der Karyotyp der Maus besteht aus 40 akrozentrischen Chromosomen, für die allerdings der Terminus "telozentrisch" die zutreffendere Benennung ist. Im Gegensatz zu den akrozentrischen Chromosomen der Gruppen D und G des humanen Karyotyps, bei denen das Centromer subterminal lokalisiert ist und die kurzen Arme Satelliten tragen, befindet sich das Centromer bei allen Chromosomen der Maus ausschließlich terminal. Die übrigen Chromosomengruppen des Karyotyps des Menschen (A, B.

C, E und F) sind metazentrisch und submetazentrisch und können daher mit Mauschromosomen nicht verwechselt werden.

Die C-Bandenfärbung bewirkte eine selektive Anfärbung des Centromers. Abb. 6 und Abb. 7 verdeutlichen die strikt terminal gelegenen Centromeren. Es handelt sich somit bei beiden Tumorzelllinien eindeutig um eine Interspecieshybridisierung.

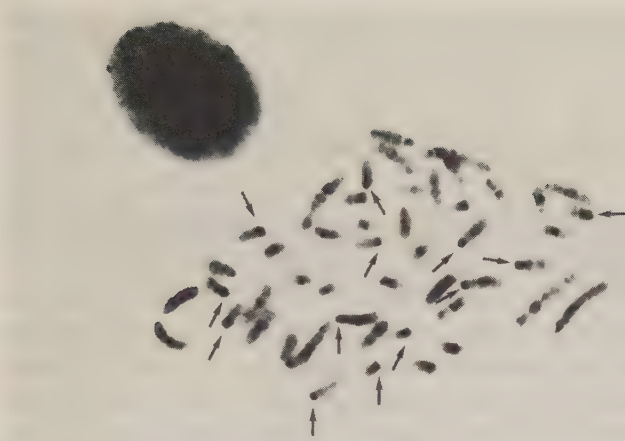


Abb. 6: Chromosomensatz einer Hybridzelle der Linie P5, der sich sowohl aus Chromosomen mit telozentrischer Lage des Centromers (Maus ↑), als auch aus solchen mit subterminaler, submetazentrischer und metazentrischer Lage des Centromers (Mensch) zusammensetzt.



Abb. 7: Chromosomensatz einer Hybridzelle der Linie P21, welcher ebenso wie Abb.6 Chromosomen enthält, die sowohl für die Maus (↑) als auch für den Menschen charakteristisch sind.

E. DISKUSSION

1. Cytogenetische Charakterisierung der permanenten Gliomzelllinien 85HG-59, 85HG-63, 86HG-39 und 87HG-31

Eine Korrelation zwischen bestimmten Chromosomendefekten und einigen Tumortypen des Menschen wurde schon in den frühen sechziger Jahren entdeckt (SANDBERG et al., 1980, 1983). Verbesserte Techniken zur Darstellung von Chromosomenbanden brachten große Fortschritte auf dem Gebiet der Erforschung von Chromosomenaberrationen.

Der erste konstante, mit einer malignen Erkrankung assoziierte Chromosomendefekt fand sich bei der chronischen myeloidischen Leukämie. Bei dem hier gefundenen Philadelphia Chromosom (Ph^1) handelte es sich um ein Chromosom der G Gruppe, Nr. 22, dem der distale Teil des q Armes fehlt (NOWELL u. HUNGERFORD, 1960). Als erster konstanter Befund bei Hirntumoren wurde ein Defekt in Form eines Ph^1 -ähnlichen Chromosoms sowie eine Monosomie des Chromosoms Nr. 22 bei Meningiomen entdeckt (ZANKL u. ZANG, 1971a, c).

Cytogenetische Befunderhebungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß Gliome sich nicht durch einen einzigen charakteristischen Defekt auszeichnen. Die stufenweise Umwandlung einer normalen zur neoplastischen Zelle ist durch eine Zunahme von tumorspezifischen Chromosomenaberrationen charakterisiert. Bei den an diesen Defekten beteiligten Chromosomen zeichnet sich eine gewisse Regelmäßigkeit ab, die den Schluß nahelegt, daß bestimmte Chromosomen bevorzugt in diese Aberrationsprozesse involviert sind. Zunächst beobachtet man einen Zuwachs oder Verlust ganzer Chromosomen. Dies betrifft zum einen den Verlust eines der Gonosomen, zum anderen den Zuwachs der Chromosomen 7 und 19 sowie den Verlust an Chromosomen der Gruppe 10 oder 22 (BIGNER et al., 1984). Das Auftreten von

Markerchromosomen wird erst in einer späten Phase der Tumorentwicklung beobachtet.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit analysierten Gliomzelllinien handelt es sich mit Ausnahme der Zelllinie 86HG-39 ausschließlich um Linien, die erst in sehr späten in vitro Passagen karyotypisiert wurden. Das Karyogramm der Gliomzelllinie 86HG-59, bei der es sich um ein Glioblastom mit sarkomatösem Anteil handelt, entstand in der 176. in vitro Passage. Bei einer Anzahl von 61 bis 66 Chromosomen hat diese Zelllinie einen Chromosomensatz im triploiden Bereich. Dieser Befund gilt als typisch für eine permanente Zelllinie, bei der im Rahmen der in vitro Etablierung eine Entwicklung vom diploiden zum triploiden Karyotyp über eine tetraploide Zwischenstufe zu beobachten ist (LEVAN et al., 1958; MAKINO et al., 1965; MARK et al., 1977; REY et al., 1983).

In den letzten Jahren ist es gelungen, nunmehr 18 zelluläre Proto-Onkogene zu identifizieren und bestimmten Chromosomenbanden zuzuordnen (YUNIS, 1983; de la CHAPELLE u. BERGER, 1984; SHAPIRO, 1986). Dies eröffnet neue Möglichkeiten, Markerchromosomen im Rahmen einer Karyotypanalyse nicht nur zu benennen, sondern auch Überlegungen darüber anzustellen, welche biologischen Konsequenzen eine Duplikation, Deletion oder Translokation an dem betreffenden Chromosom für eine Tumorzelle haben kann. Bei den Proto-Onkogenen handelt es sich um rezessive Gene, die normalerweise nicht exprimiert werden. Diese Gene werden dereprimiert, indem durch Deletionen ihre normalen Kontrollmechanismen aufgehoben werden. Die Produkte spielen bei Teilung, Wachstum und Differenzierung der Zelle eine Rolle (BISHOP, 1983). Ihre Expression fördert die Entwicklung des malignen Phänotyps der Zelle (SHAPIRO, 1986). Die genaue Manifestation der Produkte dieser Onkogene auf zellulärer Ebene ist erst wenigen Fällen genauer bestimmbar.

Allerdings ist mittlerweile bekannt, daß die Introduktion eines einzelnen Onkogens nicht alleine für die Ausbildung des malignen Phänotyps verantwortlich ist, sondern daß immer mehrere Onkogene gleichzeitig an der als "Mehrstufenprozess" verlaufenden Zelltransformation beteiligt sind (SHAPIRO, 1986).

Bei der Gliomzelllinie 85HG-59 findet sich zusätzlich zu den beiden Chromosomen Nr. 3 das Markerchromosom 3p-, welches von SHAPIRO et al., (1981) bei Astrocytomen beschrieben wurde. Der Teil des p Armes, der oberhalb der Chromosomenbande 2.1. liegt, fehlt diesem Chromosom. Das Onkogen c-raf-1 ist auf dem oberen Teil des p Armes (3p 2.5) des Chromosoms Nr. 3 lokalisiert. Die genaue Funktion dieses Onkogens bei Gliomen des Menschen ist noch unklar. Zudem findet man einen Zuwachs an abnormen Chromosomen Nr. 6, 6p- und 6p+. Der Marker 6p+ wurde von REY et al., (1983) bei Astrocytomen beobachtet, 6p- von MARK et al., (1977) und SHAPIRO (1986). Es ist anzumerken, daß sich das Onkogen c-HH-ras-1 auf der Chromosomenregion 6p 2.3 - q 1.2 und das Onkogen c-myb auf der Bande 6q 2.3 des Chromosoms Nr. 6 befindet. In der Gruppe der Chromosomen Nr. 7 findet sich zum einen ein zusätzliches 7p-Markerchromosom, das bereits von MARK et al., (1977) bei Astrocytomen erwähnt wurde. Auch das andere hinzugewonnene Markerchromosom dieser Gruppe, 7q-, wurde als häufiger Befund bei Astrocytomen und Glioblastomen beschrieben (MARK et al., 1977; BIGNER et al., 1984, 1986a, 1987). Das Proto-Onkogen c-erb B, das die Information für den EGFR ("epidermal growth factor receptor") enthält, ist auf dem Chromosom Nr. 7 lokalisiert. Bei dem EGF Rezeptor handelt es sich um ein Glykoprotein, welches aus vier Untereinheiten besteht. Das c-erb B Proto-Onkogen codiert drei dieser Untereinheiten. Liegt eine vermehrte Expression des EGF Rezeptorproteins vor, so

stimuliert dies die Zellproliferation. Es bestehen kontroverse Ansichten darüber, auf welche Weise diese vermehrte Expression des Proto-Onkogens c-erb B initiiert wird. Bei Untersuchungen an einigen Gliomzelllinien wurde mit Hilfe der Gel-Elektrophorese eine Überexpression des EGF Rezeptorproteins festgestellt, die mit einem Zuwachs an Chromosomen Nr. 7 einherging (BLIN et al., 1987; SHAPIRO, 1986). SHAPIRO (1986) nahm an, daß die Ploidie des Chromosoms eine Form der Amplifikation des Onkogens c-erb B darstellt. BIGNER et al., (1987) untersuchte 33 Biopsien maligner Gliome mit erhöhter EGF Rezeptorprotein Expression in Bezug auf Zuwachs an Chromosomen Nr. 7 und konnte bei 81% der Gliome "double minutes" (DM's) finden. Nur 58% der Gliome mit erhöhtem EGFR zeigten eine Polysomie des Chromosoms Nr. 7. Ferner konnte im Zusammenhang mit der Amplifikation des EGFR eine erhöhte Rate an Strukturanomalien des Chromosoms Nr. 7 aufgezeigt werden. BIGNER et al., (1987) schlossen aus diesem Ergebnis, daß der Sitz der vermehrten Gene zum einen auf den DM's und zum anderen auf den strukturell veränderten Chromosomen Nr. 7 lokalisiert sein dürfte. Die Ursache für eine Derepression könnte ein durch Deletion oder Translokation verursachter Verlust der Kontrollmechanismen sein. Eine Polysomie der Chromosomen Nr. 7 wurde hier in keinem Zusammenhang mit der Amplifikation des EGFR gesehen. Das nächste auftretende Markerchromosom C8q+ wurde bislang nicht beschrieben. Hingegen wurde das Markerchromosom 8q-mehrfach untersucht. Beim Burkitt-Lymphom wurde vor allem das Markerchromosom 8q- als Folge der Translokation eines Segments des q Armes auf die Chromosomen 14, 2 oder 22 diskutiert (Klein, 1983; MANOLOV u. MANOLOVA, 1972; LENOIR et al., 1982; ROWLEY, 1983; YUNIS, 1983). Auf dem Chromosom Nr. 8 ist das Gen c-myc lokalisiert. Man nimmt an, daß beim Burkitt-

Lymphom dieses Gen in die Chromosomenregion eines transkriptionell aktiven Immunglobulins der Chromosomen 14, 2 oder 22 transloziert wird.

Das Chromosom Nr. 10 liegt bei dieser Zelllinie vierfach vor. Dies stellt einen für Gliome typischen Befund dar (REY et al., 1983; BIGNER et al., 1984). Ferner liegt ein Markerchromosom 10p- vor. Dies wurde bereits bei Astrocytomen Grad III und IV beschrieben (REY et al., 1983).

Einen weiteren erwähnenswerten Befund stellt das Vorkommen des Markerchromosom 14p+ dar. Auf dem p Arm befindet sich hier das Segment 6q 1.2 →ter des Chromosoms Nr. 6. Da sich das c-HH ras-1 Onkogen auf der Region 6p 2.3 - q 1.2 des Chromosoms Nr. 6 befindet, kann angenommen werden, daß dieses teilweise vom Chromosom Nr. 14 kontrolliert wird. Einen weiteren Befund dieser Gliomzelllinie stellt eine Nullisomie der Chromosomen E 18, die bisher noch nicht beschrieben wurde, dar. Keines der bisher bekannten Onkogene liegt auf diesem Chromosom. Darüber hinaus findet man in der Gruppe G der Gliomzelllinie 85HG-59 eine Vermehrung des Chromosoms Nr. 20. Hier befindet sich das Onkogen c-scr, ein gleichfalls dominantes Onkogen.

Die zweite, im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisierte Gliomzelllinie ist die aus einem Astrocytom Grad II etablierte Zelllinie 85HG-63. Der Chromosomensatz ist mit einer hypertriploiden bzw. hypotetraploiden Anzahl von Chromosomen gleichfalls als typisch für eine erfolgreich in vitro etablierte Zelllinie zu werten. Der Umstand, daß sehr viele Chromosomenmarker diese Zelllinie charakterisieren, ist hingegen für ein Astrocytom Grad II eher untypisch. Möglicherweise ist die lange in vitro Kultivationszeit (168. Passage) dafür verantwortlich. Zunächst läßt sich der Verlust eines der Gonosomen, des Y Chromosoms, bemerken. Weiterhin findet sich

das Markerchromosom C 7q- in Verbindung mit einem Zuwachs der Chromosomen Nr. 7. Dieser Befund und seine cytogenetische Bedeutung wurden bereits bei der Zelllinie 85HG-59 diskutiert. Darüber hinaus beobachtet man in der Gruppe C einen Zuwachs an Chromosomen Nr. 8, die das c-myc Onkogen codieren. Zudem liegt der Chromosomenmarker C 9p+ vor. Deletionen und Translokationen, deren Bruchstellen auf dem p Arm des Chromosoms Nr. 9 liegen, gehören zu den häufigsten Strukturanomalien bei Gliomen des Menschen (BIGNER et al., 1986a, b). Auf diesem Chromosom sind keine Onkogene oder andere Faktoren, die die Wachstumseigenschaften beeinflussen, lokalisiert. Allerdings ist auf der Region 9p 1.3 - p2.4 eine Gruppe von Interferon-Genen (TRENT et al., 1982) lokalisiert. BIGNER et al., (1986b) beschrieben eine Gliomzelllinie, D 263 MG, die 2 Chromosomenmarker mit Bruchstellen auf dem 9p Arm enthielt. Weitere Chromosomenmarker dieser Zelllinie sind der 10p- sowie der 12p- Marker (BIGNER u. MARK, 1984). Auf der Region 12p 1.2 - q2.4 dieses Chromosoms ist das Onkogen c-HK-ras-2 lokalisiert. Das vorliegende Markerchromosom D 13p+ wurde auch bei der Gliomzelllinie 372 MG von MARK et al., (1977) geschildert, wohingegen die Marker D 15q- bislang bei Gliomen noch nicht beobachtet wurden. Auf der Region des q Armes 15q 2.6 ist das c-fes-Onkogen lokalisiert. Ferner läßt sich noch ein Zuwachs der Chromosomen Nr. 20 beobachten, die das c-src-Onkogen enthalten.

Die Glioblastomlinie 86HG-39 wurde in der 27. in vitro Passage karyotypisiert, wobei sich das Vorhandensein einer Stammlinie im hypodiploiden bzw. diploiden Bereich zeigte. Man beobachtet hier eine Tendenz zur Ausbildung von Seitenlinien in der hypotetraploiden/tetraploiden Region. Dieses Entwicklungsmuster ist typisch für eine Tumorzelllinie im Rahmen der Entwicklung zu einer permanenten Zelllinie. Eine instabile

Zelllinie, die ihren Chromosomensatz vor einer bestimmten kritischen Anzahl von Passagen verdoppelt (19. - 30. Passage), vollzieht den entscheidenden Schritt für eine erfolgreiche in vitro Etablierung. Für Gliome ist eine Verdoppelung des diploiden Chromosomensatzes zum Überleben in der Langzeitkultur notwendig (BIGNER et al., 1987). Die Gliomzelllinie (86HG-39) weist in dieser Phase der Entwicklung mit Ausnahme von 9p+ keine weiteren Markerchromosomen auf. Auffallend bei dieser Zelllinie ist der Befund einer Nullisomie für die Chromosomen D 13 in den meisten Mitosen. Dieses Phänomen wurde bereits bei der Gliomzelllinie HeRo beschrieben (FISCHER et al., 1985; WERNER, 1987).

Die Gliomzelllinie 87HG-31 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch nicht karyotypisiert. Die bislang vorliegenden Angaben genügen jedoch für eine Klassifizierung dieser Zelllinie, die bereits in der 24. Passage einen Chromosomensatz im hypertriploiden Bereich besitzt. Die Entwicklungsstufen, die für eine erfolgreiche in vitro Etablierung unerlässlich sind (Verdoppelung des diploiden Chromosomensatzes, Einpendeln in die hypotetraploide bis hypertriploide Region), wurden hier bereits vollzogen, so daß diese Linie in der 24. Passage schon als permanent bezeichnet werden kann. Veränderungen am Chromosom Nr. 22 wurden bei keiner der karyotypisierten Zelllinien beobachtet. Eine Monosomie der Chromosomen Nr. 22 oder eine Deletion vor allem des q Armes stellt einen häufigen Befund bei Meningiomen des Menschen dar (ZANKL u ZANG, 1971a, c; YAMADA et al., 1980; AL SAADI et al., 1987). Allerdings wird auch bei Gliomen häufig ein Verlust (BIGNER et al., 1986a), ein Zuwachs oder eine Chromosomenaberration (YAMADA et al., 1986; SHAPIRO, 1986) dieses Chromosoms beobachtet. Eine Hyperploidie in dieser Chromosomengruppe wird meist zusammen mit einer erhöhten Expression des PDGF Rezeptorpro-

teins (plated-derived growth factor) beobachtet. Das PDGF Rezeptorprotein ist wie das EGF Rezeptorprotein verantwortlich für eine Stimulation der Zellproliferation. Es wird durch das auf dem Chromosom Nr. 22 liegende Onkogen c-sis codiert. Die vermehrte Expression dieses Onkogens kann sowohl durch einen Zuwachs an Chromosomen Nr. 22, als auch durch Aberration dieses Chromosoms provoziert werden.

2. Cytogenetische Charakterisierung der Gliomzelle 85HG-66 und der aus Transplantaten etablierten Zelllinien 85HG-66-T6, T7 und T8

Die Gliomzelllinie 85HG-66 wurde aus einem Astrocytom Grad III in vitro propagiert. Der Chromosomensatz im hypertriploiden/hypotetraploiden Bereich ist charakteristisch für eine permanente Gliomzelllinie in der 163. in vitro Passage. Das hier vorliegende Isochromosom Nr. 1 wurde bisher im Rahmen der cytogenetischen Charakterisierungen von Gliomen des Menschen nicht beschrieben. Markerchromosomen mit Bruchstellen im Bereich des q Armes dieses Chromosoms wurden hingegen mehrfach erwähnt (YAMADA et al., 1980; REY et al., 1983). Die genetische Information des q-Armes liegt hier doppelt vor. Allerdings ist keines der bisher bekannten Onkogene hier lokalisiert. Im Gegensatz zur Gliomzelllinie 85HG-59, bei der der Translokationspartner des Chromosomenmarkers C 8q- nicht bestimmt werden konnte, liegt hier wahrscheinlich eine Translokation 14q+, t (+14q → ter::8q 11.2 → ter) vor. Dies würde bedeuten, daß sich das Gen c-myc unter der Kontrolle des Promotors des transkriptorisch aktiven Immunglobulin Gens auf dem Chromosom Nr. 14 befindet. Man nimmt an, daß sich durch diesen Kontrollmechanismus die Expression des Gens c-myc verändert (SHAPIRO, 1986).

Die Gliomzelllinie 85HG-66 wurde in der 125. in vitro Passage erstmals in die thymusaplastische Nacktmaus transplantiert. Die Karyotypisierung der aus den Transplantaten etablierten Zelllinien 85HG-66-T6, T7 und T8 ergab das Vorliegen eines humanen Karyotyps.

Die bei der Charakterisierung der Ursprungszelllinie gefundenen Markerchromosomen blieben zum größten Teil in den aus Transplantaten etablierten Zelllinien konstant. C 6q+, C 8q- und ein Marker der Gruppe D 14q+ sind verloren gegangen. Das Auftreten neuer Chromosomenmarker wurde nicht beobachtet. Es handelt sich um eine außerordentlich stabile Zelllinie, die ihre Charakteristika bereits über 8 in vitro/in vivo Wechselpassagen bewahrt hat. Aus diesen Gründen kann diese Linie für die Erzeugung von Transplantationstumoren für klinisch relevante in vivo Untersuchungen als geeignet angesehen werden.

Die Befunde der in dieser Arbeit charakterisierten Gliomzelllinien stimmen mit dem Karyotypprofil maligner Gliome des Menschen überein, das von vielen Autoren beschrieben wird (MARK et al., 1977; BIGNER u. MARK, 1984; REY et al., 1983; BIGNER et al., 1984, 1986a, b, 1987; SHAPIRO, 1986; BLIN et al., 1987). Dieselben Chromosomen sind regelmäßig an Chromosomenaberrationen in der gleichen Form beteiligt. Dies betrifft auch andere Arten von Tumoren (YUNIS, 1984). Man kann daraus schließen, daß die Anzahl der Onkogene, die an der Teilung, dem Wachstum und der Differenzierung der Zelle beteiligt sind, limitiert ist.

3. Transplantierbarkeit humaner Gliome

Die Angaben über die in vivo Etablierungsrate von über 50% (BIGNER et al., 1984) konnten in eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Von den permanenten Gliomzelllinien, die im Rahmen dieser Untersuchung in die Nacktmaus transplantiert

wurden, erwies sich lediglich die Linie 85HG-66, als tumorigen. Die beiden Gliomzelllinien 85HG-59 und 85HG-63 weisen jedoch mit Chromosomensätzen im hypotriploiden bzw. hypertriploiden/hypotetraploiden Bereich und ihren Markerchromosomen die gleichen Voraussetzungen für ein in vivo Wachstum auf. Als Erklärung dafür, warum gerade diese beiden Gliomzelllinien sich nicht in vivo propagieren ließen, könnte sowohl die Immunogenität dieser Tumorzellen, als auch der Immunstatus der Rezipienten angeführt werden. Die Wirkung von NK-Zellen, die aufgrund der Thymuslosigkeit der Nacktmaus nicht in T-Lymphocyten überführt werden können, ist der Grund für die geringe Angehrate vieler Tumoren auf "nu/nu" Mäusen (FORTMEYER, 1981). Dies um so mehr, als die Effektivität der NK-Zellen mittels bakterieller und anderer Einflüsse soweit gesteigert werden kann, daß Tumortransplate wieder abgestoßen werden können. Die Zelllinie 86HG-39 ist eine instabile diploide Linie mit Entwicklungstendenz zur Tetraploidie. Auch bei der Gliomzelllinie 87HG-31 sind mit einem Chromosomensatz im hypertriploiden Bereich bereits die Voraussetzungen für eine erfolgreiche in vivo Propagierung gegeben.

Die Zelllinien P5 und P21 stammen aus Tumortransplantaten nach in vivo/in vivo Serienpassagen maligner Gliome. Die Specieszuordnung, welche in der 31. in vitro Passage erfolgte, zeigte, daß es sich hierbei um eine gemischte Zellpopulation handelt. Man darf vermuten, daß die Ursprungstumoren einen diploiden Chromosomensatz ohne Tendenz zu einer Instabilität in Form des Erwerbs von Seitenlinien im tetraploiden Bereich besaßen. Die zahlreichen in vivo/in vitro Passagen haben offensichtlich zu einer Interspecieshybridisierung geführt. Es liegt nahe, daß an diesem Tumormodell erhobene experimentelle Daten keinesfalls auf die beim Menschen vorliegenden Verhältnisse übertragbar sind. Daraus ergibt sich die Bedeutung ei-

ner Karyotypanalyse der aus Xenotransplantaten etablierten Tumorzelllinien.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die permanenten Gliomzelllinien 85HG-59, 85HG-63, 85HG-66, 86HG-39 und 87HG-31 wurden karyotypisiert. Es fand sich ein für maligne Gliomzelllinien charakteristisches Karyotypprofil. Die Gliomzelllinie 86HG-39 zeigte eine hypodiploide bis diploide Stammlinie mit Seitenlinien im tetraploiden Bereich. Die drei anderen Zelllinien wiesen Chromosomensätze in der hypo-/hypertriploiden, hypotetraploiden und tetraploiden Region auf. Ein Chromosomenzuwachs wurde vor allem in den Gruppen C 7, C 8, C 10, D 14, F19, F 20, G 21 und G 22 beobachtet. Die gefundenen Markerchromosomen zeigten in allen Linien ein relativ einheitliches Muster. Die Marker 6p+, 7q-, 8q-, 10p- und 14q+ wurden am häufigsten beobachtet. Es zeigte sich, daß die wichtigsten für Teilungs-, Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Zelle verantwortlichen Onkogene auf diesen in Aberrationen einbezogenen Chromosomen liegen.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit die Tumorigenität der cytogenetisch charakterisierten Gliomzelllinien durch Inoculation von 10×10^6 Zellen in NMRI-"nu/nu" Nacktmäuse untersucht. Dabei zeigte sich, daß lediglich die Zelllinie 85HG-66, an der Inoculationsstelle zur Tumorbildung führte. Die aus diesen Transplantaten etablierten Tumorzelllinien zeigten den Karyotyp des Menschen. Sie wiesen den Verlust einiger Chromosomen bei einer Konstanz der bereits in der Ursprungszelllinie enthaltenen Markerchromosomen auf.

Darüber hinaus wurden die Tumorzelllinien P5 und P21 untersucht. Diese wurden nach in vivo/in vivo Serienpassagen in vitro etabliert. Die Chromosomenanalyse ergab, daß eine Interspecieshybridisierung in den NMRI-"nu/nu" Mäusen vorlag. Die erzielten Ergebnisse zeigen, daß:

- a. Tumorzelllinien mit einem Chromosomensatz im triploiden Bereich sich am besten sowohl für eine in vitro als auch für eine in vivo Propagierung eignen, und
- b. die in vivo/in vivo Serientransplantation von stabilen Tumorzellen offensichtlich zu Interspecieshybridisierungen führt.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung durch die W. Sander-Stiftung (Sta-86.005.1) und durch den C. Bohneward-Fonds für Krebsforschung, Universität München, durchgeführt.

SUMMARY

CHROMOSOMAL PATTERNS OF IN VITRO ESTABLISHED HUMAN GLIOMA
CELL LINES

The permanent glioma cell lines 85HG-59, 85HG-66, 86HG-39 and 87HG-31 were karyotyped. A karyotype profile, characteristic for malignant glioma cell lines was found. The glioma cell line 86HG-39 showed a diploid stemline with sidelines in the tetraploid region. The three other cell lines indicated chromosomal patterns in the hypotriploid, hypotetraploid and tetraploid region. A gain of chromosomes was specifically seen in the groups C7, C8, C10, D14, F19, F20, G21 and G22. The marker chromosomes found, showed a relatively uniform pattern in all lines. The markers 6p+, 7q-, 8q-, 10q- and 14q+ were the ones most observed. It was shown that the most important oncogenes, responsible for the division, growth and differentiation processes of the cell are on those chromosomes which are involved in aberrations. Further, the tumorigenicity of the cytogenetically characterized glioma cell lines was examined by inoculation of 10×10^6 cells in NMRI "nu/nu" nude mice within this study. It was hereby proved that only the cell line 85HG-66 led to the development of tumors at the inoculation site. The tumor lines established from these transplants showed the human karyotype. They demonstrated the loss of several chromosomes maintaining the marker chromosomes which had already been detected in the original cell line. Furthermore, the tumor cell lines P5 and P21 were examined. These were established in vitro after serial passages in vivo/in vivo. The chromosomal studies resulted in interspecies hybridisation (man x mouse) in the NMRI-"nu/nu" mice. The results obtained, show that:

- a. tumor cell lines with a chromosomal pattern within the triploid mode were best suited for in vitro, as well as in vivo propagation and
- b. that the in vivo/in vivo serial transplantation of stable tumor cells obviously lead to interspecies hybridisation.

G. LITERATURVERZEICHNIS

- AL SAADI, A., LATIMER, F., MADERICIC, M., ROBBINS, T.:
Cytogenetic studies of human brain tumors
and their clinical significance.
II. Meningioma
Cancer Genet. Cytoenet. 26, 127-141 (1987)
- BALDWIN, R.W., PIMM, M.V.: Human tumor xenografts in
athymic nude mice: non-specific host re-
jection responses.
In: S. SPARROW (ed.) *Immunodeficient ani-
mals in cancer research*. Macmillan Press,
London 1980
- BASTERT, G.: Human mammary tumors in athymic rodents.
In: G. BASTERT, H.P. FORTMEYER, H. SCHMIDT-
MATHIESEN (eds) *Thymus aplastic nude mice
and rats in clinical oncology*.
G. Fischer Verlag, Stuttgart - New York
1981
- BIGNER, D.D., KVEDOR, I.P., SHAFFER, T.C.: Factors
influencing the cell type of brain tumors
induced in dogs by Schmidt-Ruppin Rous
sarcoma virus.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 31, 585-595 (1972)
- BIGNER, S.H., BULLARD, D.E., PEGRAM, C.E., WIKSTRAND,
C.W., BIGNER, D.D.: Relationship of in vitro
morphologic and growth characteristics of
established human glioma-derived cell lines
to their tumorigenicity in athymic nude mice.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 40, 390-409 (1981)
- BIGNER, S.H., MARK, J., MAHALEY, M.S., BIGNER, D.D.:
Patterns of the early, gross chromosomal
changes in malignant human gliomas.
Hereditas 101, 103-113 (1984)
- BIGNER, S.H., MARK, J., BULLARD, D.E., MAHALEY, M.S.,
BIGNER, D.D.: Chromosomal evolution in
malignant human gliomas starts with speci-
fic and usually numerical deviations.
Cancer Genet. Cytoenet. 22, 121-135
(1986a)

- BIGNER, S.H., FRIEDMAN, H.S., BIEGEL, J.A., WIK-STRAND, C.J., MARK, J., GEBHARDT, R., ENG, L.F., BIGNER, D.D.: Specific chromosomal abnormalities characterize four established cell lines derived from malignant human gliomas.
Acta Neuropathol.(Berl.) 72, 86-97 (1986b)
- BIGNER, S.H., MARK, J., BIGNER, D.D.: Chromosomal progression of malignant human gliomas from biopsy to establishment as permanent lines in vitro.
Cancer Genet. Cytogenet. 24, 163-176 (1987a)
- BIGNER, S.H., WONG, A.J., MARK, J., MUHLBAIER, L.H., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B., BIGNER, D.D.: Relationship between gene amplification and chromosomal deviations in malignant human gliomas.
Cancer Genet. Cytogenet. 29, 165-170 (1987b)
- BIGNER, S.H., MARK, J.: Chromosomes and chromosomal progression of human gliomas in vivo, in vitro and in athymic nude mice.
Prog. exp. Tumor Res. 27, 67-82 (1984)
- BIRKMAYER, J.G.D.: "Tumorbiologie"
Karger Verlag, Basel 1984
- BISHOP, J.M.: Cellular oncogenes and retroviruses.
Ann. Rev. Biochem. 52, 301-354 (1983)
- BLIN, N., MÜLLER-BRECHLIN, R., MEESE, E., ZANG, K.D.: Enhanced expression of four cellular oncogenes in a human glioblastoma cell line.
Cancer Genet. Cytogenet. 25, 285-292 (1987)
- BLOOM, H.: Intracranial tumors: response and resistance to therapeutic endeavors.
Int. J. Radiol. Oncol. Biol. Phys. 8, 1083-1113 (1982)
- BOVERI, Th.: Zur Entstehung maligner Tumoren.
Fischer Verlag Jena 1914

- BRADLEY, N.J., BLOOM, H.J.G., DAVIES, A.J.S., SWIFT, S.M.: Growth of human gliomas in immune-deficient mice: A possible model for preclinical therapy studies.
Br. J. Cancer 38, 263-272 (1978)
- BULLARD, D.E., SCHOLD, S.C., BIGNER, S.H., BIGNER, D.D.: Growth and chemotherapeutic response in athymic mice of tumor arising from human glioma-derived cell line.
J. Neuropath. exp. Neurol. 40, 410-427 (1981)
- BURTON, R.C., HOLMES, M.C., WARNER, N.L., WOODRUFF, M.F.A.: Mechanisms of resistance to syngenic tumors in athymic (nude) mice.
In: T. NOMURA (ed.) Proc. Sec. Intern. Workshop Nude Mice, G. Fischer Verlag, Stuttgart - New York 1987
- de la CHAPELLE, A., BERGER, R.: Report of the committee on chromosome rearrangements in neoplasia and on fragile sites.
Cytogenet. Cell. Genet. 37, 274-311 (1984)
- COBB, L.M.: The hamster as a host for the growth of human tumor cell population.
Cancer Res. 34, 958-963 (1974)
- CRAFTS, D., WILSON, C.B.: Animal models of brain tumors.
Brain Tumor Therapy Natl. Cancer Inst. Monogr. 46, 11-17 (1977)
- DAVIES, A.J.S.: Immunodeficient animals.
In: S. SPARROW (ed.) Immunodeficient animals in cancer research, MacMillan Press, London 1980
- DISERENS, A.C., de TRIBOLET, N., MARTIN-ACHARD, A., GAIDE, A.C., SCHNEGG, J.F., CARREL, S.: Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18.
Acta Neuropathol. (Berl.) 53, 21-28 (1981)

- DRUCKREY, H., IVANKOVIC, S., PREUSSMANN, R.: Selektive Erzeugung von Hirntumoren bei Ratten durch Methylnitrosoharnstoff. Naturwissenschaften. 51, 144-146 (1964)
- EDDY, B.E., BORMANN, G.S., BERKLEY, W.H., YONG, R.D.: Tumors induced in hamsters by injection of rhesus monkey kidney cell-extracts. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107, 191-197 (1961)
- EDDY, B.E., BORMANN, G.S., GRUBBS, G.E., YONG, R.D.: Identification of the oncogenic substance in monkey kidney cell cultures as SV40. Virology 17, 65-75 (1962)
- EDWARDS, M., LEVIN, V., WILSON, C.: Brain tumor chemotherapy: An evaluation of agents in current use in phase II and III trials. Cancer Treat. Rep. 64, 1179-1205 (1980)
- ENGERT, A., KIRCHNER, H.H., SCHAADT, M., DIEHL, V.: Intracranial transplantation of human hematopoietic cell lines in nude mice: a preclinical screening model for cytostatic drugs. Anticancer Res. 7, 49-54 (1987)
- EPENETOS, A.A., COURTENAY-LUCK, N., PICKERING, D., LAVENDER, J.P., MCKENZIE, C.G.: Antibody guided irradiation of brain glioma by arterial infusion of radioactive monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor and blood group A antigen. Br. Med. J. 290, 1463-1466 (1985)
- EPENETOS, A.A., NIMMOW, C.C., ARKLIE, J., ELLIOT, A.T., HAWKINS, L.A., KNOWLES, R. W., BRITTON, K.E., BODMER, W.F.: Detection of human cancer in animal model using radio-labelled tumor associated monoclonal antibodies. Brit. J. Cancer 46, 1-8 (1982)

- FARBER, E.: The multistep nature of cancer development.
Cancer Res. **44**, 4217-4223 (1984)
- FISCHER, H., SCHWECHHEIMER, K., HEIDER, M., BERNHARDT, S., ZANG, K.: Establishment and characterization of a human glioblastoma cell line with a stable karyotype and nullisomy 13.
Cancer Genet. Cytogenet. **17**, 257-268 (1985)
- FLANAGAN, S.P.: "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse.
Genet. Res. Camb. **8**, 295 (1966)
- FOGH, J., TISO, J., ORFEO, T., SHARKEY, F.E., DANIELS, W.P., FOGH, J.M.: Thirty-four lines of six human tumor categories established in nude mice.
J. Natl. Cancer Inst. **64**, 745-751 (1980)
- FOLKMANN, J., MERLER, E., ABERNATHY, C., WILLIAMS, G.: Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis.
J. Exp. Med. **133**, 275 (1971)
- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie, Wissenschaftsverlag, Mannheim/Wien/Zürich 1983
- FORTMEYER, P.H.: Thymusaplastische Maus (nu/nu), Thymusaplastische Ratte (rnu/rnu). Schriftenreihe Versuchstierkunde, 8 Parey Verlag, Berlin - Hamburg 1981
- FRANKS, C.R., BONGLER, L.R., GARRETT, A.J. Metastatic growth in human tumor xenografts in thymectomized irradiated mice reconstituted with syngeneic bone marrow cells
Eur. J. Cancer **11**, 619-622 (1975)
- FRANKS, C.R., BISHOP, D., REESON, D.: The growth of tumor xenografts in thymectomized high-dose irradiated mice reconstituted with syngeneic bone marrow cells incubated with antithymocyte serum
Br. J. Cancer **33**, 112-115 (1976)

- FREEDMAN, V.H., BROWN, A.L., KLINGER, H.P., SHIN, S.: Mass production of animal cells in nude mice with retention of cell specific markers.
Exp. Cell Res. **98**, 143-151 (1976)
- GERSHWIN, M.E., CASTLES, J.J.: T cell differentiation and autoimmune phenomena in congenitally athymic (nude) New Zealand mice. In: N.D. REED (ed.) Proc. Third Int. Workshop Nude Mice. G. Fischer Verlag New York - Stuttgart 1981
- GIOVANELLA, B.C., YIM, S.O., MORGAN, A.C., STEHLIN, S., WILLIAMS, L.J. jr.: Metastases of human melanoma transplanted in "nude" mice.
J. Nat. Cancer Inst. **50**, 1051 (1973)
- GIOVANELLA, B.C., STEHLIN, J.S.: Heterotransplantation of human malignant tumors in "nude" thymusless mice. I. Breeding and maintenance of "nude" mice.
J. Natl. Cancer Inst. **51**, 615 (1973)
- GIOVANELLA, B.C., STEHLIN, J.S., WILLIAMS, L.J. jr.: Heterotransplantation of human malignant tumors in "nude" thymusless mice. II. Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors.
J. Natl. Cancer Inst. **52**, 921-930 (1974)
- GIOVANELLA, B.C., STEHLIN, J.S.: Assessment of the malignant potential of cultured cells by injection in "nude mice". In: RYGAARD, J., POVLSEN, C.O. (eds) Proc. 1st Int. Workshop on Nude Mice G. Fischer Verlag, Stuttgart 1974, pp 279-284
- GIOVANELLA, B.C., STEHLIN, J.S., WILLIAMS, L.J., LEE, S.S., SHEPARD, R.D.: Heterotransplantation of human cancers into nude mice.
Cancer **42**, 2269-2281 (1978)

- GIOVANELLA, B.C., FOGH, J.: Present and future trends in investigations with the nude mouse as a recipient of human tumor transplants.
In: J. FOGH, B.C. GIOVANELLA (eds)
The nude mouse in experimental and clinical research. Academic Press, New York - San Francisco - London 1978
- GOLDENBERG, D.M., BHAN, R.D., PAVIA, R.A.: In vivo human-hamster somatic cell fusion indicated by glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase profiles.
Cancer Res. 31, 1148-1152 (1971)
- GOLDENBERG, D.M., PAVIA, R.A., TSAO, M.C.: In vivo hybridisation of human tumor and normal hamster cells.
Nature 250, 649-651 (1974)
- GREENE, H.S.N.: The transplantation of tumors to the brain of heterologous species.
Cancer Res. 11, 529-534 (1951)
- GREENE, H.S.: The transplantation of brain tumors to brains of laboratory animals.
Cancer Res. 13, 422-426 (1953)
- GREIG, N.H.: Chemotherapy of brain metastases: Current status.
Cancer Treat. Rev. 11, 157-186 (1984)
- GREIG, N.H.: Optimizing drug delivery to brain tumors.
Cancer Treat. Rev. 14, 1-28 (1987)
- HANSTEEN, J.L.: Chromosome studies in glial tumors.
Eur. J. Cancer, 3, 183 (1967)
- HOLDEN, H.T., HERBERMAN, R.B., SANTONI, A., NUNU, M.E.: Natural cell-mediated cytotoxicity in nude mice.
In: D.P. HOUCHENS, A.A. OVEJERA (eds)
Proc. Symp. on the Use of Athymic (nude) Mice in Cancer Research, G. Fischer Verlag, New York - Stuttgart 1978

- INGRAM, M., SHELDEN, C.H., JAKES, S., SKILLEN, R.G., BRADLEY, W.G., TECHY, G.B., FRESH-WATER, D.B., ABTS, R.M., RAND, R.W.: Preliminary clinical trial of immuno-therapy for malignant gliomas.
J. Biol. Resp. Med. 6, 489-498 (1987)
- IVERSEN, H.G.: Studier over heterolog transplan-tation af humane tumorer, adaption af tumorer til en heterolog organisme samt cortico-steroiders indflydelse pa tumorers metasering.
Universitetsforlaget, Arhus 1962, p. 54
- KAMEYA, J., SHIMOSATO, Y., HAYASHI, H., TSUMURAYA, M.: Growth and differentiation of hormon - producing human tumors in nude mice.
In: T. NOMURA (ed.) Proc. Sec. Int. Workshop Nude Mice, G. Fischer Verlag, New York - Stuttgart 1977
- Kaye, A.K., MORSTYN, G., GARDNER, J., PYKE, K.: Development of a xenograft glioma model in mouse brain.
Cancer Res. 46, 1367-1373 (1986)
- KERSTING, T.C.: Zur Morphologie der durch Methyl-nitrosoharnstoff erzeugten Hirntumoren bei der Ratte.
Naturwissenschaften 51, 144-145 (1964)
- KERSTING, T.C.: Pathomorphologische Vergleichs-untersuchungen diaplazentar und post-natal erzeugter Hirntumoren.
Verh. dtsh. Ges. Path. 52, 384-388 (1968)
- KIM, U., HAN, T., GOSHS, S., SHIN, S., PRESS-MAN, D.: Immunological mechanism of graft resistance to certain malig-nant tumors and prevention of me-tastasis by athymic mice.
In: N.D. REED (ed.) Proc. Third Int. Workshop Nude Mice, G. Fischer Verlag, New York - Stuttgart 1981

- KINDRED, B., WECHSLER, W.: Comparison of rat nervous system tumor clones grown in syngeneic rats and mice.
In: D.P. HOUCHEMS, A.A. OVEJERA (eds) Proc. Symp. on the Use of Athymic (Nude) Mice in Cancer Research, G. Fischer Verlag, New York - Stuttgart 1978
- KIRSCHSTEIN, R.L., GERBER, P.: Ependymomas produced after intracerebral inoculation of SV40 into newborn hamsters.
Nature 195, 299-300 (1962)
- KLEIHUES, P., MATSUMOTO, S., WECHSLER, W., ZÜLCH, K.J.: Zur Klassifikation transplazentar mit Äthylnitrosoharnstoff erzeugter neurogener Tumoren des Nervensystems.
Verh. dtsh. Ges. Path. 52, 372-379 (1968)
- KLEIN, G.: Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men.
Cell 32, 311-315 (1983)
- KOWALCZYK, J., SANDBERG, A.A.: A possible subgroup of ALL with 9p-.
Cancer Genet. Cytogenet. 9, 383-385 (1983)
- von LAMPERT, F., KARSCH, P., GOLDENBERG, D.M.: Chromosomen von heterolog und homolog transplantierten Human- und Hamstertumoren.
Arch. Geschwulstforsch. 32, 309-321 (1968)
- LENOIR, G.M., PREUD'homme, J.L., BERNHEIM, A.: Correlation between immunoglobulin light chain expression and variant translocation in Burkitts lymphoma.
Nature 298, 474-476 (1982)
- LEVIN, V.: Chemotherapy of recurrent brain tumors.
In: A. PRESTAYAKO, S. CROOKE (eds) Nitrosoureas: Current status and future developments. Academic Press, New York 1981

- LEVIN, V.: Chemotherapy of primary brain tumors.
Neurol. Clin. 3, 855-866 (1985)
- LEVAN, D., BIESELE, J.J.: Role of chromosomes in carcinogenesis as studied in serial tissue culture of mammalian cells.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 71, 1022-1053 (1958)
- LOOR, F., ROELANTS, G.E.: High frequency of T lineage lymphocytes in nude mouse spleen.
Nature 251, 229 (1974)
- LOOR, F., ROELANTS, G.E.: Immunofluorescence studies of a possible prethymic T-cell differentiation in congenitally athymic (nude) mice.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 254, 226 (1975)
- LUBS, H.A., SALMON, J.H.: The chromosomal complement of human solid tumors. Part II. Karyotypes of glial tumors.
J. Neurosurg. 22, 160 (1965)
- MAHALEY, M.S., GENTRY, R.E., BIGNER, D.D.: Immunobiology of primary intracranial tumors. Part 2. The evaluation of chemotherapy and immunotherapy protocols using the avian sarcoma virus glioma model.
J. Neurosurg. 47, 35-43 (1977)
- MAKINO, S., SASAKI, M.S., FUKUSHIMA, T.: Cytological studies of tumors. XLI. Chromosomal instability in human chorionic lesions.
Okajimas Folia Anat. Jpn. 40, 439-465 (1965)
- MANOLOV, G., MANOLOVA, Y.: Marker bands in one chromosome 14 from Burkitt lymphoma.
Nature 237, 33-34 (1972)
- MANUELIDIS, E.E.: Experiments with tissue culture and heterologous transplantation of tumors.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 159, 409-431 (1969)

- MARK, J.: Chromosomal characteristics of neurogenic tumors in adults.
Hereditas 68, 61-100 (1971)
- MARK, J.: G-band analysis of an established cell line of a human malignant glioma.
Humangenet. 22, 323-326 (1974)
- MARK, J., WESTERMARK, B., PONTEN, J., HUGOSSON, R.: Banding patterns in human glioma cell lines.
Hereditas 87, 243-260 (1977)
- MIHICH, E., LAURENCE, D.J.R., LAURENCE, D.M., ECKHARDT, S.: UICC workshop on new animal models for chemotherapy of human solid tumors.
UICC Technial Report Series 15, 19 (1974)
- NICOLSON, G.L.: Tumor cell instability, diversification, and progression to the metastatic phenotype. From oncogene to oncofetal expression.
Cancer Res. 47, 1473-1487 (1987)
- NOWELL, P.C., HUNGERFORD, D.A.: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.
Science 132, 1497 (1960)
- PANTELOURIS, F.M.: Absence of thymus in a mouse mutant.
Nature 217, 370-371 (1968)
- PONTEN, J.: Neoplastic human glia cells in culture.
In: J. FOGH (ed.) Human tumor cells in vitro. Plenum Press New York 1975, p. 557

- POPESCU, N.C., CIOLOCA, L., LICIN, F., ENCU, J.: A study of some tumors of human origin. I. Chromosomes of rat tumor (HR 18) and mouse tumor (HM 18) obtained by heterotransplantation of a human melanocarcinoma. Europ. J. Cancer **6**, 175-180 (1970)
- POVLSEN, C.O., RYGAARD, J.: Heterotransplantation of human adenocarcinomas of the colon and rectum to the mouse mutant nude. A study of nine consecutive transplantations. Acta path. microbiol. Scand. Sect. A, **79**, 159-169 (1971)
- POVLSEN, C.O., RYGAARD, J.: Heterotransplantation of human epidermoid carcinoma to the mouse mutant "nude". Acta path. microbiol. Scand. **80**, 713 (1972)
- POVLSEN, C.O., FIALKOW, P.J., KLEIN, E., KLEIN, G., RYGAARD, J., WIENER, F.: Growth and antigenic properties of a biopsy-derived Burkitt's lymphoma in thymus-less (nude) mice. Int. J. Cancer **11**, 30-39 (1973)
- POVLSEN, C.O., RYGAARD, J.: Refection patterns of three human malignant tumors transplanted in thymus grafted nude mice. Acta path. microbiol. Scand. Sect. C. **83**, 413 (1975)
- POVLSEN, C.O., VISFELDT, J., RYGAARD, J., JENSEN, G.: Growth patterns and chromosome constitutions of human malignant tumors after long term serial transplantation in nude mice. Acta path. microbiol. Scand. Sect. A. **83**, 709-716 (1975)
- RANA, M.W., PINKERTON, H., THORNTON, H., NAGY, D.: Heterotransplantation of human glioblastoma multiforme and meningiomas to "nude" mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **155**, 85-89 (1977)
- RANKIN, J.K., YUNG, W.K.A., SHAPIRO, W.R.: Chromosomal evolution of early passage cells derived from human gliomas. Amer. J. Hum. Genet. **32**, 85A (1980)

- REID, L.M., HOLLAND, J., JONES, C., WOLF, B., NIWAYAMA, G., WILLIAMS, R., KAPLAN, N.O., SATO, G.: Some of the variables affecting the success of transplantation of human tumors into the athymic nude mouse. In: D.P. HOUCHEMS, A.A. OVEJERA (eds) Proc. Symp. on the Use of Athymic (nude) Mice in Cancer Research. G. Fischer Verlag, New York - Stuttgart 1978, pp 107-121
- REID, L.M., SHIN, S.: Transplantation of heterologous endocrine tumor cells in nude mice. In: J. FOGH, B.C. GIOVANELLA (eds) The nude mouse in experimental and clinical research. Academic Press New York - San Francisco - London 1978
- REID, L.M., MINATO, N., BLOOM, B. JONES, C., HOLLAND, J.: Rejection of tumor cells by athymic nude mice. In: N.D. REED (ed.) Proc. third intern. workshop nude mice. G. Fischer Verlag New York - Stuttgart 1984
- REY, J.A., BELLO, M.J., de CAMPOS, J., BENITEZ, J., AYUSO, M.C., VALCAREL, E.: Chromosome studies in two human brain tumors. Cancer Genet. Cytogenet. 1, 159-165 (1983)
- REY, J.A., BELLO, M.J., RAMOS, C., BENITEZ, J., MUELAS, J.M.: Serial cytogenetic study of a human glioma cell line. Cancer Genet. Cytogenet. 8, 287-295 (1983)
- ROUSSEAU-MERCK, M.F., BIGEL, P., MOULY, H., FLAMANT, F., ZUCKER, J.M., WACHE, A.C., NEZELOF, C.: Transplantability in nude mice of embryonic and other childhood tumors. Br. J. Cancer 52, 279-283 (1985)

- RYGAARD, J., POVLSEN, C.O.: Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice.
Acta path. microbiol. Scand. 77, 758 (1969)
- RYGAARD, J.: Immunodeficiency in nude mice.
In: G. BASTERT, H.P. FORTMEYER, H. SCHMIDT-MATTHIESEN (eds)
Thymus aplastic nude mice and rats in clinical oncology.
G. Fischer Verlag, Stuttgart
New York 1981
- SAADI, A.A. LATIMER, F.: Non-random chromosomal abnormalities in human brain tumors.
Amer. J. Hum. Genet. 32, 61A (1980)
- SANDBERG, A.A.: The chromosomes in human cancer and leukemia
Elsevier-North Holland Press, Amsterdam
1980
- SANDBERG, A.A.: A chromosomal hypothesis of oncogenesis.
Cancer Genet. Cytogenet. 8, 277-285 (1983)
- SATO, V.L., WAKSAL, S.D., HERZENBERG, L.A.: Identification and separation of pre T-cells from nu/nu mice. Differentiation by preculture with thymic reticuloepithelial cells.
Cell Immunol. 24, 173 (1976)
- SATYA-PRAKASH, K.L., PATLAK, S., HSU, T.C., OLIVE, M., CAILLEAU, R.: Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: High frequencies of 1q, 11q and HeLa-like marker chromosomes.
Cancer Genet. Cytogenet. 3, 61-73 (1981)
- SELA, M., HURWITZ, E.: Conjugates of antibodies with cytotoxic drugs.
In: C.W. VOGEL (ed.) Immunoconjugates, Antibody conjugates in radioimaging and therapy of cancer. Oxford University Press, New York - Oxford 1987, pp 189-216

- SHAPIRO, W.R., BASLER, G.A., CHERNIK, N.L.,
POSNER, J.B.: Human brain tumor
transplantation into nude mice.
J. Natl. Cancer Inst. 62, 447-452
(1979)
- SHAPIRO, J.R., YUNG, W.K.A., SHAPIRO, W.R.:
Isolation, karyotype and clonal
growth of heterogenous subpopu-
lations of human malignant gliomas.
Cancer Res. 41, 2349-2359 (1981)
- SHAPIRO, J.R., PU, P.Y., SHAPIRO, W.R.:
Resistant cell types in human
gliomas.
In: S.E. SALMON, J.M. TRENT (eds)
Human tumor cloning Grune - Stratton -
Orlando, Florida 1984, pp 133-142
- SHAPIRO, J.R.: Cellular characterization and
BCNU resistance of freshly resected
and early passage human glioma cells
Progr. Neuropath. 6, 133-143 (1986a)
- SHAPIRO, J.R.: Biology of gliomas: Heterogeneity,
oncogenes, growth factors.
Semin. in Oncol. 13, 4-15 (1986b)
- SHARKEY, F.E.: Histopathological observations on
a nude mouse colony.
In: J. FOGH, B.C. GIOVANELLA (eds)
The nude mouse in experimental and
clinical research Academic Press,
New York - San Francisco - London
1978
- SHIN, S., REID, L.C., COLBURN, P.C., KADISH, A.S.,
FLEISCHER, N.: Development of transplan-
table functional endocrine tumor lines
in nude mice.
In: T. NOMURA (ed.) Proc. Sec. Int.
Workshop nude mice, G. Fischer Verlag,
Stuttgart - New York 1977
- SINGER, H., ZANG, K.D.: Cytologische und cyto-
genetische Untersuchungen an Hirntumoren.
Humangenet. 9, 172-184 (1970)

- SONTA, S., OSHIMORA, M., EVANS, J.T., SANDBERG, A.A.: Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XX. Banding patterns of primary tumors. J. Natl. Cancer Inst. **58**, 49-53 (1977)
- SORDAT, B., FRITSCH, R., MACH, J.-P., CARREL, S., OZZELLO, L., CEROTTINI, J.-C.: Morphological and functional evaluation of human solid tumors serially transplanted in nude mice. In: J. RYGAARD, C.O. POVLSEN (eds) Proc. first int. workshop nude mice. G. Fischer Verlag, Stuttgart 1974, pp 269-278
- STAVROU, D.: Morphologische und enzymhistochemische Untersuchungen an experimentellen PNS Tumoren der Ratte. Arch. Geschwulstforsch. **34**, 297-308 (1969a)
- STAVROU, D.: Morphologie und Histochemie experimentell induzierter Hirntumoren beim Kaninchen. Z. Krebsforsch. **73**, 98-109 (1969b)
- STAVROU, D.: Beitrag zur Morphologie und Enzymhistochemie experimenteller Tumoren des Zentralnervensystems der Ratte. Acta Neuropathol. (Berl.) **15**, 220-230 (1970)
- STAVROU, D., MELLERT, W., BILZER, Th., SENEKOWITSCH, R., KEIDITSCH, E., MEHRAEIN, P.: Radioimmuno-detection of gliomas by administration of radiolabelled monoclonal antibodies. Experimental data. Anticancer Res. **5**, 147-156 (1985a)
- STAVROU, D., MELLERT, W., BILZER, Th., SENEKOWITSCH, R., KEIDITSCH, E., MEHRAEIN, P.: Localization of experimental glioma grafts by means of iodinated monoclonal antibodies and radionuclide imaging. Acta Neuropathol. (Berl.) **66**, 340-342 (1985b)

- STAVROU, D., GLÄSSNER, H., BILZER, Th., SENEKO-WITSCH, R., KEIDITSCH, E., MEHRAEIN, P.: Radioimaging of experimental glioma grafts using F(ab')₂-fragments of monoclonal antibodies.
Anticancer Res. 6, 897-904 (1986)
- TAETLE, R., JONES, O.W., HONEYSETT, J.M., ABRAMSON, J., BRADSHAW, C., REID, S.: Use of nude mouse xenografts as pre-clinical screens.
Cancer 60, 1836-1841 (1987)
- THERMAN, E.: Human chromosomes, structure, behavior. effects.
Springer Verlag, New York - Heidelberg - Tokyo 1986
- TOGUNAGA, T., YAMAMOTO, S.: Augmentation of host defence of nude mice against cancer. In: T, NOMURA (ed.) Profc. sec. int. workshop nude mice, G. Fischer Verlag, Stuttgart - New York 1977
- TRENT, J.M., OLSON, S., LAWN, R.M.: Chromosomal localization of human leucocyte, fibroblast and immune interferon genes by means of in situ hybridization.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7809-7813 (1982)
- VISFELDT, J., POVLSEN, C.O., RYGAARD, J.: Chromosome analysis of tumors following heterotransplantation to the mouse mutant nude.
Acta path. microbiol. Scand. 80, 169-176 (1972)
- WALKER, M.D., ALEXANDER, E., HUNT, H.E.: Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial.
J. Neurosurg. 49, 333 343 (1978)
- WALKER, M.D., GREEN, S.B., BYAR, D.P.: Randomized comparison of radiotherapy and nitrosourea for the treatment of malignant glioma after surgery.
New Engl. J. Med. 303, 1323-1329 (1980)

- WEIL-HILLMANN, G., UCKUN, F.M., MANSKE, J.M., VAL-
LERA, D.A.: Combined immunochemotherapy
of human solid tumors in nude mice.
Cancer Res. 47, 579-585 (1987)
- WERNER, M.: Cytogenetische Charakterisierung von
menschlichen Tumorzelllinien vor und
nach Transformation mit SV40.
Med. Dissertation, Uni.Saarbrücken 1987
- WILSON, C.B., NORELL, H.J.R., BARKER, M.: Intra-
thecal injection of methotrexate
(NSC-740) in transplanted brain tu-
mors.
Cancer Chemother. Rep. 51, 1-6 (1967)
- YAMADA, K., KONDO, T., YOSHIOKA, M., OAMI, H.:
Cytogenetic studies in twenty human
brain tumors. Association of No. 22
chromosome abnormalities with tumors
of the brain.
Cancer Genet. Cytogenet. 2, 293-307
(1980)
- YUNIS, J.J.: The chromosomal basis of human
neoplasia.
Science 221, 227-236 (1983)
- YUNIS, J.J.: Clinical significance of high re-
solution chromosomes in the study
of acute leukemias and non-Hodgkin's
lymphomas.
In: V.F. FAIRBANKS (ed.) Current
hematology Vol. 3, Wiley Press,
New York 1984, pp 353-391
- ZANKL, H., ZANG, K.D.: Cytological and cytoge-
netical studies on brain tumors. III.
Humangenet. 12, 42-49 (1971a)
- ZANKL, H., SINGER, H., ZANG, K.D.: Cytological
and cytogenetical studies on brain
tumors. II.
Humangenet. 11, 253-257 (1971b)
- ZANKL, H., ZANG, K.D.: Cytological and cytoge-
netical studies on brain tumors. IV.
Humangenet. 14, 167-169 (1971c)

Herrn Prof. Dr. Dr. med D. Stavrou gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Dissertationsthemas und die mir jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. K. D. Zang, Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes danke ich sehr herzlich für die gewährte Arbeitsmöglichkeit in seinem Hause.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. M. Werner, Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes, für die Einarbeitung in die Methodik der Chromosomenanalyse sowie seine wertvolle Hilfe bei der Auswertung der Karyogramme danken.

Ferner schulde ich Frau M. Thönnies und Frau M. Schwartz, Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes, Dank für die technische Hilfe und die wertvollen Anregungen.

Darüber hinaus möchte ich Frau D. Wallmann und Frau A. Lechner für die technische Assistenz, Frau E. Kutter für die kollegiale Unterstützung und Herrn E. Mener für die EDV-technische Betreuung danken.

Lebenslauf

- 1957 geboren am 9. November in Wuppertal
Vater: Dr. Kurt Wöhler, Staatssekretär a.D.
Mutter: Doris Wöhler, geb. Pandel
- 1964-1967 Besuch der Volksschule in Wuppertal-Küllenhahn
- 1967-1976 Besuch des Städtischen Gymnasiums Wuppertal-Vohwinkel
- 1976 22.06. Abitur
- 1976 Juni bis Ende Oktober Sprachstudium an der Universität Perugia/Italien
- 1976-1978 Studium der Humanmedizin in Pisa/Italien
- 1978-1982 Studium der Humanmedizin in Würzburg
- 1982-1987 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians Universität in München
- 1987 23. Februar Staatsexamen
12. März Approbation
- 1987 1. März Beginn der Dissertation am Institut für Tierpathologie, Abteilung Funktionelle Pathologie (Prof.Dr.Dr.med.D.Stavrou) der Ludwig-Maximilians Universität München

